



УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП  
Факултет за медицински науки – тригодишни стручни студии  
Втор циклус на студии

Специјалистички студии – специјализација за хемиско-биохемиска  
лабораторија

**Марина Натева**

**МОЛЕКУЛАРНИ, КЛЕТОЧНИ И БИОХЕМИСКИ БИОМАРКЕРИ КАКО  
ПРЕДИКТОРИ ЗА ЦИТОТОКСИЧНОСТ ВО ОРГАНИЗМОТ**

СПЕЦИЈАЛИСТИЧКИ ТРУД

Штип, 2019 год.

Молекуларни, клеточни и биохемиски биомаркери  
како предиктори за цитотоксичност во организмот

Марина Натева

Молекуларни, клеточни и биохемиски маркери  
како предиктори за цитотоксичност во организмот

Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Специјалистички труд

Комисија за оцена и одбрана:

Ментор: Проф. д-р. Невенка Величкова

Факултет за медицински науки – тригодишни стручни студии

Претседател: Проф. д-р Билјана Ѓоргеска

Член: Проф. д-р Невенка Величкова

Член: Проф. д-р Данијела Јаниќевиќ Ивановска

## **Благодарност**

Сакам искрено и длабоко да ѝ се заблагодарам на мојата професорка и менторка, проф. д-р Невенка Величкова, за нејзината помош и совети кои многу ми помогна во изработката на овој специјалистички труд.

Благодарност кон колегите од Универзитетската клиника за клиничка биохемија – Скопје и до д-р. спец. м-р Александра Бабуловска од Универзитетска клиника за токсикологија – Скопје, за добрата соработка во текот на изработката на овој труд.

Голема благодарност и на моето семејство, кое ме поддржуваше и ми помогна во одговорите на вистинските животни прашања.

Ви благодарам!

Молекуларни, клеточни и биохемиски биомаркери  
како предиктори за цитотоксичност во организмот

### Апстракт

Биомониторингот користи различни биомаркери кои можат да го потврдат присуството на разни хемиски агенси во телото и нивните ефекти врз клетките или молекулите. Клиничката евалуација на биолошките маркери има важна улога во точната дијагноза, како и за проценката на ризикот и прифаќање на терапија што го подобрува клиничкиот исход. Овој труд ги опфаќа молекуларните, клеточните и сегашните биохемиски биомаркери како хепаталните и други ензими.

Целта на овој специјалистички труд е да се укаже на значењето на различни молекуларни, клеточни и биохемиски биомаркери, како и да се направи корелација меѓу најчесто користените биомаркери како потенцијални предвидувачки параметри преку коишто може да се следи и да се потврдува цитотоксичноста во организмот од одредени хемиски агенси.

Во оваа студија, хепатотоксичните ефекти беа следени кај пациенти со хронична срцева слабост, како и кај пациенти со дислипидемија коишто подолго време се со препишана статинска терапија. Беа следени биохемиските маркери, главно хепатални ензими (серумски аминотрансферази) како и други ензими (креатинин киназа ) со дозата и типот на статинската терапија, индекс на телесна маса и возраста во временски интервал додека трае истражувањето.

Резултатите од овој труд потврдуваат дека високите вредности на хепаталните ензими се во корелација со дозата и типот на статинската терапија, индексот на телесна маса со други параметри. Тоа значи дека поголеми дози од овие хемиски агенси можат да делуваат токсично, додека малите дози можат да имаат кумулативен ефект, да се задржат подолг временски интервал и последиците да бидат потврдени многу подоцна.

**Клучни зборови:** биохемиски биомаркери, хепатотоксични ефекти, аминотрансферази, креатинин киназа.

## Abstract

Biomonitoring uses different biomarkers, which can confirm the presence of various chemical agents in the body and their effects on cells or molecules. Clinical evaluation of biological markers plays an important role in the precise diagnosis, as well as on risk assessment and acceptance of therapy that improves clinical outcome. This patch covers molecular, cellular and current biochemical biomarkers such as hepatic and other enzymes.

The aim of this specialist paper is to indicate the significance of various molecular, cellular and biochemical biomarkers, and to make the correlation between the most commonly used biomarkers as potential predictors through which the cytotoxicity in the body of certain chemical agents can be monitored and confirmed.

In this study, hepatotoxic effects were observed in patients with chronic heart failure as well as patients with dyslipidaemia who for a long time had prescribed statin therapy. Biochemical markers were monitored mainly by hepatic enzymes (serum aminotransferases) and other enzymes (creatinine kinase) with the dose and type of statin therapy, body mass index and age interval as the research continues.

The results of this study confirm that high levels of hepatic enzymes are correlated with sodium and the type of statin therapy, body mass index and other parameters. This means that higher doses of these chemical agents can act toxic, while small doses can have a cumulative effect, retain a longer time interval, and the consequences are confirmed much later.

**Key words:** biochemical biomarkers, hepatotoxic effects, aminotransferases, creatinine kinase.

## Содржина:

1. Вовед (Introduction).....	8
1.1. Класификација на биомаркери.....	10
1.1.1.Молекуларни биомаркери за хепатотоксичност.....	12
1.1.2.Клеточни биомаркери за хепатотоксичност.....	14
1.1.3.Биохемиски биомаркериза хепатотоксичност.....	17
1.2.Статини.....	21
1.2.1.Хепатотоксичност од статини.....	26
1.2.2.Ензими на црниот дроб како биомаркери при биомониторинг за хепатотоксичност на статините.....	27
1.2.3. Значењето на хепаталните ензими како биомаркери кај пациенти со безалкохолни масни заболувања на црниот дроб со статинска терапија.....	30
1.2.4. Тестови за функцијата на црниот дроб како биомаркери при биомониторинг кај пациенти лекувани со статини, со хроничен хепатитис и црнодробна цироза.....	31
1.3. Мониторинг на креатин киназа кај пациенти со статинска терапија.....	32
2. Цел на специјалистичкиот труд (The goal of the specialized labor).....	35
3. Материјал и метод за работа (Materials and methods of work).....	36
4. Резултати и дискусија (Results and discussion).....	43
5. Заклучок (Conclusion).....	55
6. Користена литература (References and used literature).....	57

## 1. Вовед (Introduction)

Биомониторингот во корелација со развојот на молекуларната биологија, биохемијата како и генетскиот скрининг, овозможува да се детектираат цитоморфолошки и биохемиски промени кои се резултат на реакцијата на изложеноста на организмот на одредени физички, хемиски или биолошки агенси. Тоа значи дека одредени хемиски агенси или лекови, како и лекови коишто се користат подолго време, можат да имаат хепатотоксичен ефект. Освен тоа, хепаталните оштетувања предизвикани од лекови (во нашата студија, хемиски или фармацевтски агенси, како што се статини) покажуваат различни токсиколошки ефекти.

Степенот на хепатотоксиколошките ефекти на индивидуата зависи од наследените и стекнатите карактеристики, својствата и формата на агенсите, како од индивидуалните карактеристики како што се: полот, возраста, хроничната изложеност, сензитивноста и одбранбената способност. Изложеноста на хепатотоксични супстанции предизвикува промени во хомеостазата на различни биохемиски маркери во телесните течности или ткива. Во рамките на биомониторинг на човекот се користат различни биомаркери, коишто можат да го потврдат присуството на разни хемиски агенси во телото и нивните ефекти врз клетките или молекулите. Затоа, клиничката евалуација на различни биолошки маркери има важна улога во точната дијагноза, како и за проценката на ризикот и прифаќање на терапија што го подобрува клиничкиот исход.

Терминот „биомаркер“ ја означувакоја било супстанција или промена во клетките или ткивата што може да се идентификува или да се мери (WHO, 2001; Metcalf&Orloff, 2004). Во литературата постојат неколку дефиниции за биомаркери и за среќа, значително се идентични. Во 1998 година, Работната група за дефиниции на Националниот институт за здравствени биомаркери (National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group) ги дефинирала биомаркерите како „карактеристика што објективно се мери и се проценува како индикатор за нормални биолошки процеси, патогени процеси или фармаколошки одговор на терапевтска интервенција“ (NIH, 2001). Во 2001 година, во заедничко истражување за хемиска безбедност, Меѓународната програма за хемиска безбедност, предводена од Светската здравствена организација (WHO), во координација со Обединетите нации и Меѓународната организација на трудот, го дефинирале биомаркерот како „секоја супстанција, структура или процес кој може да се мери во телото или во неговите производи и да влијае или да се предвиди инциденцата на исходот или болеста“ (WHO, 2001). WHO во пошироката дефиниција ги зема предвид не само инциденцата и исходот на болеста, туку и ефектите од третманите, интервенциите, па дури и ненамерното изложување во животната средина, како што се хемикалите или



хранливите материи. Во нивниот извештај за валидноста на биомаркерите во проценката на ризикот за животната средина, соопштуваат дека вистинската дефиниција за биомаркерите го вклучува „речиси секое мерење коешто одразува интеракција меѓу биолошкиот систем и потенцијалната опасност, која може да биде хемиска, физичка или биолошка. Измерениот одговор може да биде функционален и физиолошки, биохемиски на клеточно ниво или молекуларна интеракција“ (WHO, 1993).

Биомаркерите можат да го потврдат присуството на разни хемиски агенси во телото и нивните ефекти врз клетките или молекулите. Примери за биомаркери се следење на промените на пулсот, крвниот притисок, основните хемиски супстанции до покомплексни лабораториски тестови за одредување на концентрациите на различни супстанции и нивните метаболити во биолошки медиуми, како што се крв, урина, серум, специфични ткива итн. Тоа значи дека биомаркерите се мерливи супстанции, елементи, метаболити итн. коишто се користат во клиничка проценка (концентрацијата на холестерол е добро познат биомаркер за дијагностицирањето на коронарни срцеви болести), за следење и предвидување на сериозни болести (кардиоваскуларни заболувања, дијабетес и други состојби) кај поединци или кај населението, а се користат за да се следат нормалните биолошки процеси, патогените процеси или фармаколошките реакции на терапевтската интервенција и истотака се важни во биомедицинските истражувања, а дополнително се користат и во многу научни области. Овие биомаркери овозможуваат класификација на болеста и факторите на ризик и можат да ги прошират основните информации за основната патогенеза на болеста (Voit, 2000), а во иднина ќе станат едни од главните движечки сили на фармацевтските истражувања и развојот на лекови. Тоа значи дека со клиничка лабораториска евалуација на различни биохемиски и биолошки маркери во крвта (ензими на црниот дроб, билирубин, тестови за коагулација на крв, албумин и др.), се овозможува да се потврди или да се исклучи цитотоксичниот или генотоксичниот ефект, особено во услови на хронична изложеност. Биомаркерите во модерната превентивна медицина се здобијасо огромна научна и клиничка вредност. Секој биолошки систем (на пример, кардиоваскуларниот, метаболитичкиот или имунолошкиот систем) има свои специфични биомаркери. Тие се биолошки индикатори на болести коишто можат да се измерат или *ин vivo*, со визуелизирани биомаркери (компјутерска томографија, позитронска емисиона томографија, магнетна резонанца) или *ин vitro*, со примена на одредени молекуларни, биохемиски и цитогенетски методи, со коишто директно може да се изврши детекција, скрининг и квантификација на одредени биомаркери и со тоа индиректно да се направи биомониторинг на целна група испитаници. Така, со индиректен мониторинг (следење) на молекуларни, клеточни и биохемиски маркери, како во нашата студија хепаталните ензими (серумски аминотрансферази), како и други ензими (креатин киназа) во корелација со дозата и типот на статинската терапија и

степенот на хепатотоксиколошките ефекти, може да се потврди нивната хепатотоксичност врз клетките.

Како резултат на напредокот во молекуларната биологија, развиени се нови молекуларни и клеточни биомаркери, со коишто се овозможува откривање на рани манифестации на хемиски индуцирана клеточна повреда и клеточна смрт. Интеграцијата меѓу овие нови техники во медицината и во биологијата резултираше со нови сознанија за почетните механизми на хемиски индуцирана токсичност и канцерогеност.

### 1.1. Класификација на биомаркери

Постојат три вида на различни биомаркери: биомаркер на изложеност, ефект и чувствителност (Verschaeve, 2015), (слика 1)



Слика 1. Шема на биомаркери на изложеност, ефект и подложност во карциногенезата во животната средина. Различните категории на биомаркери се презентирани привремено од канцерогена изложеност на развој на болести

Figure1. Scheme of biomarkers of exposure, effect and susceptibility in environmental carcinogenesis. The different categories of biomarkers are presented temporally from carcinogen exposure to disease development

Биомаркер на изложеност е хемиска супстанција или нејзиниот метаболит или производ на интеракција меѓу хемиска и некоја целна молекула или макромолекула во ткивата, телесните течности или во екскретите (Manno et al., 2010). Тие се маркери за рано дејство, се определуваат со квантитативни и квалитативни анализи на хемиските супстанции или биотрансформацијата на нивните метаболити, а се применуваат во медицината на трудот или медицината на животната средина, со цел да се исклучи штетната изложеност,

да се утврди нивото на изложеност кај зголемената популација на ризик. Ваквите биомаркери може да се користат само за хемиско оштетување со позната токсикокинетика и токсикодинамика и мора да бидат доволно специфични и чувствителни (значајна корелација со надворешната експозиција). Тоа значи дека биомаркерите на изложеност покажуваат присуство на нешто што може да резултира во патофизиолошка состојба: на пример, зголемени нивоа на жива во крвта, како резултат на прекумерната изложеност на овој метал, или бензен метаболити во урината од загадување поврзано со сообраќајот.

Биомаркерот на ефект е мерлив биохемиски, структурен, функционален, бихејвиорален или кој било друг вид на промена во организмот во претклиничката фаза и овозможува проценка на ризикот од генотоксични и негенотоксични канцерогени. Тие се користат во секојдневната практика во поставувањето на клиничка дијагноза, покажуваат биолошки ефект кој може да биде поврзан со утврдена или можна болест или со претходници на болеста, на пример, концентрацијата на бета-микроглобулин во урината или цистатин Ц во серумот се користат како маркери за бубрежна инсуфициенција. Тоа значи дека биомаркерите на ефект може да се користат за документирање на претклинички промени или негативни здравствени ефекти предизвикани од експозиција и апсорпција на различни хемиски агенси.

Биомаркерите на чувствителност се показатели за вродени или стекнати индивидуални разлики во реакцијата на организмот против одредени агенси или штетните ефекти на ксенобиотиците во развојот на одредени болести, на пр. варијации на одредени гени коишто се поврзани со карцином на дојката. Индивидуалните карактеристики и гео-предиспозицијата вклучуваат возраст, пол, здравствена состојба, претходна изложеност, истовремена изложеност на други агенси, вродени или стекнати варијации во метаболизмот и друго.

Биомаркерите, исто така, можат да се класифицираат врз основа на нивната примена, како што се дијагностичките биомаркери (пример: срцевиот тропонин за дијагноза на миокарден инфаркт), биомаркери на болестите (пример: мозочен натриуретичен пептид за конгестивна срцева слабост), биомаркерите за прогнозирање на болеста (пример: биомаркери за карциноми) и биомаркери за следење на клиничкиот одговор по интервенција (пример: HbA1c за антидијабетичен третман). Друга категорија на биомаркери ги вклучува оние кои што се користат при донесувањето одлуки за време на раниот развој на лековите. На пример, фармакодинамските биомаркери се маркери на одреден фармаколошки одговор и се од особен интерес за студии за оптимизација на дозата.

Изборот на соодветни биомаркери е од клучно значење поради можноста за поголема прецизност при проценката на ризикот за поединци или подгрупи на население, со донесување заклучок за ублажување и здравствена заштита.

Сепак, изборот ќе зависи од податоците однаучните сознанија и од влијанието на социјалните, етичките и на економските фактори.

### 1.1.1. Молекуларни биомаркери за хепатотоксичност

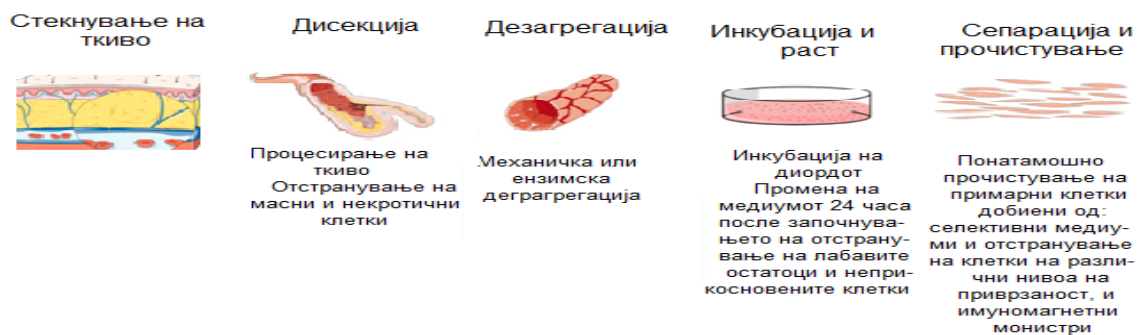
Молекуларниот биомониторинг ги следи клеточните или молекуларните промени во клетките, нивните карактеристики, делови и хемиски процеси и посветува особено внимание на тоа како молекулите ги контролираат активностите и растот на клетката. Со примена на различни молекуларни биомаркери, во молекуларната биологија може да се потврди присуството на разни хемиски агенси во телото и нивните ефекти врз клетките или молекулите. Биомаркерите во молекуларната биологија се темелат на следење на промените во нуклеинските киселини, како што се мутации на гените или полиморфизми, квантитативни молекули на генетска експресија, пептиди, протеини, метаболити на липиди и други мали молекули (Sahu et al., 2011). Биомаркерот е карактеристика на клеточно или на молекуларно ниво што може објективно да се мери како индикатор за нормални или патолошки состојби во организмот, биолошки процеси, патогени процеси или како фармаколошки одговор на терапевтската интервенција (на пример, молекулата на специфичен антиген на простатата – PSA е познат биомаркер за прелиминарна дијагноза на аденокарцином на простатата). Молекуларните биомаркери имаат биофизички својства коишто овозможуваат да се мерат во биолошки примероци (плазма, серум, цереброспинална течност или примерок земен со биопсија). Покрај тоа, со примена на овие современи биомаркери како резултат на напредокот во аналитичката хемија и молекуларната биологија, можат да се детектираат раните манифестации на хемиски индуцирана клеточна повреда и клеточна смрт и да се потврдат почетните механизми на хемиски индуцирана токсичност и канцерогеност, особено во услови на хронична изложеност.

За предвидување на метаболизмот на лековите и за проценка на хепатотоксичност, хепатоцитите се сметаат за стандард во *ин vitro* методите во молекуларниот биомониторинг. Постојат неколку техники кои често се користат во токсикологијата, вклучувајќи: примарни клеточни култури, имортализирани клеточни линии, матични клетки, 2D или 3D култури на хепатоцити (Zucco, De Angelis, Testai & Stamatii, 2004) и оптимизирани техники, вклучувајќи ја и полимерната верижна реакција (Polymer Chain Reaction–PCR).

Употребата на клеточни култури во токсикологијата е основа за анализа на физиолошките и молекуларните процеси и има примена во клеточно-специфични и метаболитички студии. Се докажало дека клеточната култура е важна за проценка на хемиското оштетување и за утврдување на цитотоксичност и има неколку предности во однос на испитувањата со животни. На пример, клеточните култури се лесни за ракување и се одржуваат под контролирано опкружување во инкубатор. Покрај тоа, клеточните култури

овозможуваат истовремено тестирање на различни соединенија и скрининг за хемиска токсичност и имаат пониска цена од испитувањата со животни. Изолирањето и прочистувањето на периферните крвни клетки лесно може да се постигне со диференцијално центрифугирање или со позитивно сортирање, користејќи магнетни моностира. Но изолирањето на чиста популација на клетки од ткиво е секогаш тешко да се направи и неопходно е да се издвои во суспензија којашто содржи само еден доминантен тип на клетка.

Слика 2 е илустрација на некои од основните постапки коишто се користат за да се изолираат клетките од примарното ткиво. За различни видови клетки има различни методи за да бидат изолирани од примарното ткиво.



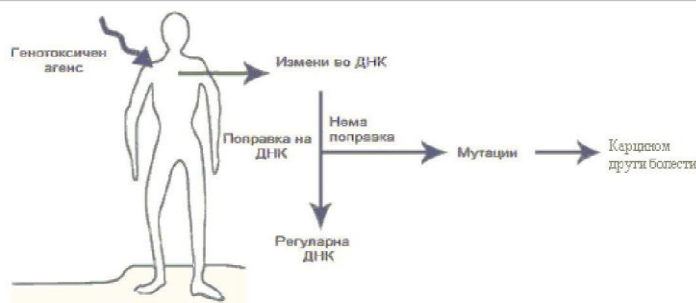
Слика 2. Основни постапкишто се користат за да се изолираат клетките од примарното ткиво

Figure 2. Basic steps used to isolate cells from primary tissue

Молекуларните биомаркери се показатели за нормалното функционирање на телото или патогенезата на клеточно и на молекуларно ниво. Се проучуваат генетските маркери на ефектите од изложеноста на ксенобиотици, се евалуираат генетските маркери на ризик и одговор и се развиваат методи за брза и точна и проценка на ризикот.

### 1.1.2. Клеточни биомаркери за хепатотоксичност

Клеточната биологија е гранка на биологијата којашто ги проучува физиолошките својства на клетките, нивната структура, органелите што ги содржат, интеракциите со нивната животна средина, нивниот животен циклус, поделба, смрт и функција на клетките на микроскопско и на молекуларно ниво. Клеточната биологија исто така е позната како цитологија. Цитогенетските биомаркери најчесто се користат во студиите за биомониторинг на човековата популација и во проценката на влијанието на еколошките, професионалните и медицинските фактори врз генотоксичноста (лимфоцитите можат да бидат индикатори за вистински целни ткива на генотоксични канцерогени), (Barrett, Vainio, Peakall & Goldstein, 1997). Слика 3 ги прикажува секвенциите на промени коишто ја поврзуваат изложеноста на генотоксичен агенс со развојот на болест.



Слика 3. Низа на настани кои поврзуваат изложеност на генотоксичен агенс и развој на болест  
Figure 3. Sequence of events linking exposure to a genotoxic agent and the development of a disease

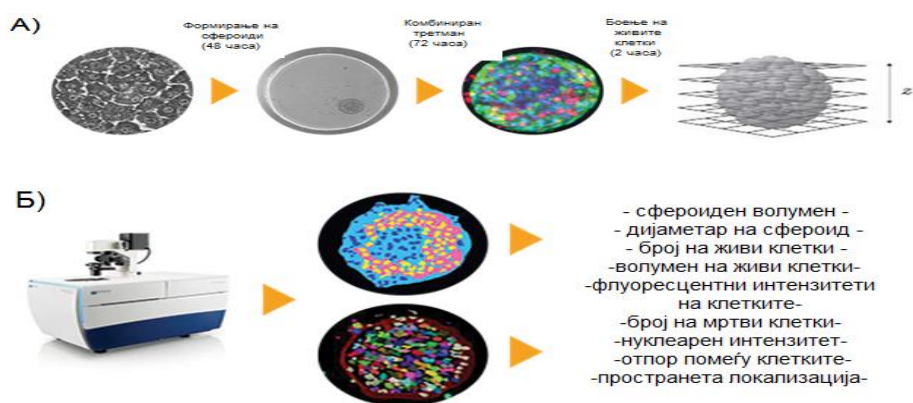
Нивната сензитивност за мерење на изложеноста на генотоксични агенси и нивната улога како рани предвидувачки параметри за ризик од карцином овозможуваат рано откривање на клеточни или патофизиолошки промени во организмот. Тоа значи дека биомаркерите на генотоксичност генерално се користат за мерење на специфична професионална и еколошка изложеност, за да се предвиди ризикот од болест или да се следи ефективност на постапките за контрола на експозицијата кај субјектите на генотоксични хемикалии (Manno et al., 2010).

Генотоксичноста предизвикана од различни агенси најчесто се испитува со помош на *ин vitro* тестови коишто детектираат цитолошки промени, како и промени во молекулата на ДНК, кои се од исклучителна важност за процесот на карциногенеза. *Ин vitro* анализите најчесто се користат за откривање на метаболизмот на лековите и за да се намали ризикот за оштетување на црниот дроб од лекови (drug-induced liver injury, DILI). Во *ин vitro* биомониторингот на хепатотоксичноста и метаболитичката активност на црниот дроб најчесто за скрининг се користат честички на црниот дроб, изолирани клетки на црниот дроб во суспензии или во примарни култури, вклучувајќи методи на ко-култура и разни супклеточни фракции и хепатоцитарни клеточни линии. Хепатоцитните култури и перифични хепатоцити се *ин vitro* техники коишто најчесто се користат кога се испитуваат патофизиолошките повреди поради различни третмани (на пример, хепатотоксини, хипоксија или аноксија, аноксија /реоксигенација), (Cerný et al., 2009, Farghali, 2008).

Сепак, во истражувањата се покажало дека таквите клетки можат да бидат метаболитички помалку активни од соодветните клетки *ин vivo*, поради неефикасна оксигенација и зголемување на отпадните производи (Macdonald et al., 1998; Gillies, Chresand, Drury & Dale, 1986). Денес, за тестирање на метаболизмот на лековите и за потврдување на потенцијалните хепатотоксични ефекти на хемикалиите и лековите, развиени се различни *ин vitro* биомаркери за изолирање на култури од хепатоцити, особено со специјални 2D или 3D техники, кои би можеле да понудат предности во дијагностицирањето и да бидат релативно евтини и да можат одново да се



произведат. Сепак, со клиничките истражувања се докажало дека 2D-културите се далеку од задоволителни поради екстензивните видни разлики или брзата дедиференцијација на хепатоцитите, што резултира со губење на фенотипот на црниот дроб и функцијата. Според тоа, технологиите на 3D-култури се користат за зголемување на интеракциите клетка-клетка, за да се создаде микро средина поблиску до онаа на телото, како и за подобрување на специфичните функции на клетките на црниот дроб *ин vitro*. Со цел да се забрзаат предвидувачките клинички истражувања во областа на клеточната биологија, се докажало дека има зголемен интерес за употребата на 3D сфероиди (Chang&Hughes-Fulford, 2009; Kunz-Schughart, 2004). На слика 4 е прикажан оптимизиран метод за формирање 3D сфероиди на црниот дроб, добиени од човечки индуцирани плурипотентни матични клетки (iPS). Тие може да се користат за скрининг на цитотоксичност и генотоксичност, исто така и да се идентификуваат механизмите кои се вклучени во хепатотоксичност индуцирана од лекови.



**(A) iCell Hepatocytes were grown in 2D format for 7 days prior to using them to prepare 3D cultures. Following spheroid formation, the liver micro tissues were treated with compounds for 72 hours, then stained for 2 hours and imaged. Z-planes were acquired using the ImageXpress Micro Confocal system. – (A) iCell хепатоцитите 7 дена се одгледуваат во 2D формат, пред да ги користат за подготовка на 3D култури. По формирањето сфероиди, микроткивата на црниот дроб биле третирани со соединенија во текот на 72 часа, потоа обоени во текот на 2 часа и сликани. Z-рамнините се добиени со користење на ImageXpress Micro Confocal систем. – (B) The acquired Z-plane images were used to generate sets of 2D and 3D image segmentation, which were analyzed to quantify key phenotypic features of the 3D cultures. – (B) Добиените слики во Z-рамнина се користат за генерирање сетови од сегментација на 2D и 3D слики, кои беа анализирани за да се квантифицираат клучните фенотипски карактеристики на 3D-културите.**

Слика 4. Тест за хепатотоксичност со користење на 3D сфероидни црнодробни микроткива добиени од iCell хепатоцитите.

Figure 4. Hepatotoxicity assay using 3D spheroid liver micro tissues derived from iCell Hepatocytes.

Бидејќи од суштинско значење е да се имаат сигурни и релевантни, минимално инвазивни биомаркери за да се подобри спроведувањето на биомониторингот, дијагностиката и третманот на болестите предизвикани од хепатотоксичноста или поврзани со неа, како и со генотоксичното оштетување, се прават многубројни обиди за развивање методи за проценка на ризикот, врз основа на клеточни биомаркери (Bjornsson & Olsson, 2005; Chen et al., 2015; Schadt et al., 2015). Тоа

значи дека за да се подобрат предвидувањата на DILI, многу истражувачки групи се фокусирале на *ин vitro* методи за DILI со човечки хепатоцити (Albrech, 2017), бидејќи се покажа како речиси невозможно да се докаже ризикот за идиосинкротичен DILI во претклиничките експерименти со животни (Funk & Roth, 2017; Robles-Diaz et al., 2016).

### 1.1.3. Биохемиски биомаркериза хепатотоксичност

Хемиските соединенија, и од природно и од синтетичко потекло, предизвикуваат токсиколошки ефект кога нивната доза е висока или времетраењето на изложеноста е долго, така што се предизвикува промена во нормалната хомеостаза на телесните течности и ткива. Телото најчесто се детоксицира од лекови и од други хемиски соединенија преку црниот дроб. Тој е еден од најважните и најкомплексни органи во човечкиот организам. Поради неговата специфична улога во метаболичките процеси во организмот, елиминацијата на лекови, во регулирањето на биохемиските процеси, порталната локација во циркулацијата и анатомската и физиолошка структура тој е чувствителен на токсичните ефекти на лековите, ксенобиотиците и оксидативниот стрес. Хепатотоксичноста е потенцијално несакано дејство на голем број лекови, токсини, додатоци во исхраната, фитотерапевтици и други супстанции, кои се манифестираат во многу форми на оштетување на црниот дроб, од клеточна дегенерација и некроза, до цироза или холестаза и васкуларна повреда. Изложеноста на хепатотоксични супстанции го менува хомеостатското балансирање на разни биомаркери, што овозможува динамичен пристап за разбирање на спектарот на заболувања на црниот дроб. Овие маркери нудат можност за хомогена класификација на болеста, факторите на ризик, и можат да ги прошират основните информации за основната патогенеза на болеста и влијанието на лековите врз самите хепатоцити.

Биохемиски биомаркери коишто се користат во клиничката практика при диференцијално дијагностицирање и мониторирање на супклиничка повреда на црниот дроб од хемиски или од фармацевтски агенси се лабораториски тестови со коишто се потврдува промената на нормалната функција на црниот дроб (хомеостаза), дијагностицирана со разлики во концентрацијата на серумскиот вкупен билирубин (Tbil) и вкупните жолчни киселини, или промени во ткивниот и клеточниот интегритет, кои се дијагностицираат со одредување



на активноста на ензимите (аланин аминотрансфераза –ALT, аспартат аминотрансфераза – AST, γ-глутамилтрансфераза – GGT, лактат дехидрогеназа – LDH и алкална фосфатаза – AP). Овие ензими помагаат во важни хемиски реакции во телото, се произведуваат во црниот дроб и вообичаено се присутни во хепатоцитите, меѓутоа доколку црниот дроб е оштетен или повреден, ензимите на црниот дроб се ослободуваат во крвта, предизвикувајќи промена на ензимската активност. Како дополнителни тестови за функција на црниот дроб може да се користат вкупните протеини (TP), албумин (Alb) и протромбинското време (PT) и тие се маркери за капацитетот на биосинтезата на црниот дроб.

Поради недостаток на специфични биомаркери за дисфункција на црниот дроб хепатотоксичност предизвикана од хемиски агенси или лекови што се администрираат во телото во зголемени концентрации за долго време, DILI се следи и се дијагностицира врз основа на биомаркери како што се лабораториските тестови за ALT, AST, AP и одредување на концентрација на Tbil. Вообичаено се користат во комбинација како генерички показатели за оштетување на црниот дроб. Лабораториската клиничка проценка на ваквите биомаркери е важна за дијагностицирање, лекување или превенција на болеста и за подобро разбирање на процесот на болеста како резултат на токсични ефекти на хемиско соединение (Rifai, Gillette & Carr, 2006).

Според неодамнешната верзија на упатствата на FDA за повреди на црниот дроб предизвикани од лекови: клиничка оценка пред пуштање на пазарот (FDA guidance for industry drug-induced liver injury: Premarketing clinical evaluation) се препорачува како DILI биомаркери да се користи комбинација од четири лабораториски тестови (FDA, 2009). Во табела 1 се наведени овие четири биомаркери и други потенцијални серумски биомаркери коишто се користат во претклиничките и клиничките скрининзи за хепатотоксичност. Меѓу овие лабораториски тестови, како биомаркери за хепатотоксичност, некои се посспецифични и/или чувствителни од другите за токсичноста на црниот дроб. На пример, серумските покачувања на вредностите на ALT и AST укажуваат на хепатоцелуларно оштетување, зголемената активност на AST во серумот е индицирано кај хепатобилијарни заболувања, но е индицирано и при поставување дијагноза и следење на текот на болеста кај инфаркт на миокардот и заболувања на скелетните мускули (Burhop, Gordon and Estep, 2004; Nathwani, Pais, Reynolds and Kaplowitz, 2005). Серумската ALT активност исто така е поврзана и со мускулна некроза, додека зголемената активност на AP е поврзана со хепатобилијарна повреда. Меѓутоа, зголемената активност на ALT во серумот го рефлектира оштетувањето на хепатоцитите и се смета за високо чувствителен и прилично посспецифичен од AST (Рушковска, 2019), како претклинички и клинички биомаркер за хепатотоксичност, бидејќи е присутен главно во клеточната цитоплазма на хепатоцитите, додека AST е присутен и во цитоплазматска и во митохондријална форма во црниот дроб, срцето,

скелетните мускули, бубрезите, мозокот, панкреасот и во ткивото на белите дробови, како и во белите и црвените крвни клетки (Giboney, 2005).

Табела1. Биохемиски биомаркери кои се сметаат за корисни во идентификување на хепатална токсичност

Table 1. Biochemical biomarkers that are considered useful in identifying hepatic toxicity

Биомаркер Biomarker	Хепатоцелуларен Hepatocellular	Хепатобилијарен Hepatobiliary	Митохондријален Mitochondrial
<b>Аланин аминотрансфераза</b> Alanine aminotransferase (ALT)	X		
<b>Аспартат аминотрансфераза</b> Aspartate aminotransferase (AST)	X		
<b>Алкална фосфатаза</b> alkaline phosphatase (ALP)		X	
<b>Гама глутамилтрансфераза</b> Gammaglutamyltransferase (GGT)		X	
<b>Вкупен бибилирубин</b> total bilirubin (TBILI)		X	
<b>5'-нуклеотидаза</b> 5'-nucleotidase (5-NT)		X	
<b>Сорбитол дехидрогеназа</b> sorbitol dehydrogenase (SDH)	X		
<b>Глутамат дехидрогеназа</b> glutamate dehydrogenase (GLDH)	X		X
<b>Вкупни жолчни киселини</b> total bile acids (TBA)	X	X	
<b>Потенцијални помошни маркери</b> Potential ancillary markers			
<b>Лактат</b> /lactate			X
<b>Лактат дехидрогеназа</b> lactate dehydrogenase (LDH)	X		
<b>Орнитин карбамилтрансфераза</b> ornithine carbamyltransferase (OCT)	X		
<b>Неконјугиран билирубин</b> unconjugated bilirubin (UBILI)	X		

За да се дијагностицира DILI, законот на Хи (Hy's law) се смета за дијагностички значаен, а тој се заснова на клинички опсервацки испитувања направени од страна на Хајман Цимерман (Hyman Zimmerman), во коишто докажал дека пациентите со DILI со хепатоцелуларен тип на оштетување на црниот дроб и жолтица, имаат 10-50% повисок ризик од морталитет или потреба од трансплантација на црн дроб (Zimmerman 1978; 1999). Во овие клинички истражувања се докажало дека само зголемената вредност на ALT нуди мала предвидлива вредност во однос на клиничкиот тек на DILI, но може да обезбеди индикација преку параметрите за проценување, кога се комбинира со одредување на концентрацијата на Tbil. Табела 2, според Законот на Хју, ја наведува хепатотоксичноста, којашто се дефинирала како зголемена активност на ALT во серум, трипати повисока од горната референтна вредност, придружена со зголемени концентрации на Tbil поголеми за двапати од горната референтна вредност, во отсуство на хепатобилијарна повреда дијагностицирана со одредување на активноста на AP.

Табела 2. Законот на Хју

Table 2. Hy's law

**Набљудувањето направено од Хјуман Цимермансугерира ризик одсмртност од 1 до 10 од DILI ако се исполнети следните три критериуми:**

Observation made by late Hyman Zimmerman suggesting a 1 in 10 mortality risk of DILI if the following three criteria are met:

**1. Серумски ALT илиAST >3 × ULN**

1.Serum ALT or AST >3 × ULN

**2. Серумскиот вкупен билирубин е покачен на >2 × ULN, без првични наоди на холеостаза (зголемена серумска алкална фосфатаза)**

2.Serum total bilirubin elevated to >2 × ULN, without initial findings of cholestasis (elevated serum alkaline phosphatase)

**3. Не може да се најде ниту една друга причина за да се објасни комбинацијата на зголемени аминотрасфери и билирубин, како што се вирусниот хепатитис А, Б, Ц или други претходно постоечки или акутни заболувања на црниот дроб.**

3.No other reason can be found to explain the combination of increased aminotransferases and bilirubin, such as viral hepatitis A, B, C, or other preexisting or acute liver disease

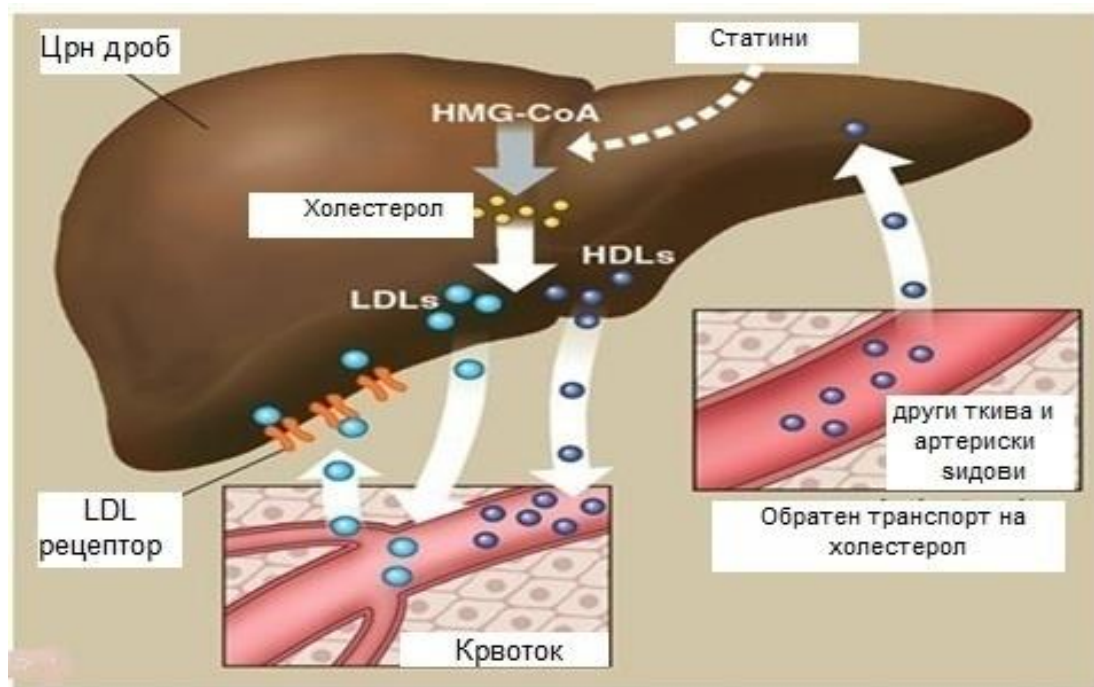
**ALT –аланин аминотрансфераза; AP – алкална фосфаза;AST –аспартат аминотрансфераза; DILI – оштетување на црниот дроб предизвикано од лекови**

Неодамна, Законот на Хју е изменет, со зголемување на прагот на активност на ALT до петпати од горната референтна вредност и вклучувајќи ја активноста на AP за потврдување на хепатобилијарно заболување од DILI (Amacher, Schomaker & Aubrecht, 2013). Иако овој дијагностички критериум е корисен за дијагностицирање на тешки DILI, постојат неколку недостатоци кои треба да се подобрат, затоа што овие биомаркери откриваат оштетување откако ќе се случи и на тој начин имаат ограничена вредност на параметрите за проценка. Од друга страна, зголемувањето на концентрацијата на Tbil во серумот, иако тој ја одразува дисфункцијата на црниот дроб и е специфичен за црниот дроб, релативно е нечувствителен бидејќи неговите вредности се зголемуваат подоцна, по прогресијата на болеста. Спротивно на тоа, зголемувањето на активноста на ALT во серумот често може да укажува на транзиторно хепатоцелуларно оштетување коешто не напредува кон тешко оштетување (Amacher et al., 2013). Затоа, во иднина, со цел да се процени ефектот на биотрансформацијата и хепатотоксичноста на лекот врз црниот дроб, за да се подобри постоечкиот дијагностички концепт на DILI, особено во разликување на клинички релевантни благи случаи на DILI од тешките случаи и да може да се подобри дијагнозата и управувањето со DILI, неопходни се нови и специфични биомаркери кои можат да ги надополнат оние што во моментот се користат. Во фокусот е ензимот цитохром P450 (CYP) со неговите шест различни изоензими (CYP1A2, -2C9, -2C19, -2D6, -2E1 и -3A4), за коишто се докажало дека се одговорни за повеќе од 90% од активноста на оксидативната биотрансформација на лекови (Arimoto, 2006).

## 1.2.Статини

Високите серумски концентрации на липидните параметри се најзначајните фактори на ризик за кардиоваскуларни заболувања. Намалување на концентрацијата на липидите со употреба на лекови е дополнително потребно во превенцијата и третманот. Поради ова се направени истражувања, со цел да се обезбеди можност за спречување на прогресивниот тек на оваа патолошка состојба, најчесто предизвикана од метаболички нарушувања на масти во телото, со рано започнување на соодветни терапевтски мерки во оваа група на пациенти. Постојат повеќе лекови коишто го намалуваат нивото на холестеролот, од нив најчесто употребувани се статините (Torpy, Burke & Glass, 2009), кои главно се користат во лекување на докажана хиперхолестеремия и комбинирана хиперлипидемија (Mills, et al., 2011; Mitka, 2003; Shukry, Rashed & Zubaid, 2009), особено кај индивидуи со покачени концентрации на LDL-холестерол (Low Density Lipoproteins = липопротеини со мала густина), (Forrester & Libby 2007).

Со експериментални истражувања се докажало дека статините се инхибитори на 3-хидрокси-3-метилглутарил коензим А редуктаза (HMG-CoA редуктаза), односно своето дејство го постигнуваат со спречување на активноста на ензимот HMG-CoA редуктаза, кој е важен за синтеза на холестеролот во сите клетки, а особено во црниот дроб (Istvan & Deisenhofer, 2001). Инхибиторниот ефект на статините врз HMG-CoA редуктазата се докажало дека се темели на структурната сличност со самиот ензим. Ова ја намалува ендегената синтеза на холестеролот во клетките на црниот дроб, коишто се главната цел на статините и ја намалуваат количината на холестерол во овие клетки. Ова доведува до синтеза на негативни повратни информации, односно експресија на специфичните рецептори за LDL на површината на хепатоцитите, поради што повеќе LDL холестерол е катаболизиран во клетките за овие рецептори. Ова ја намалува концентрацијата на LDL-холестерол, но исто така и вкупниот холестерол во крвта (слика 5).



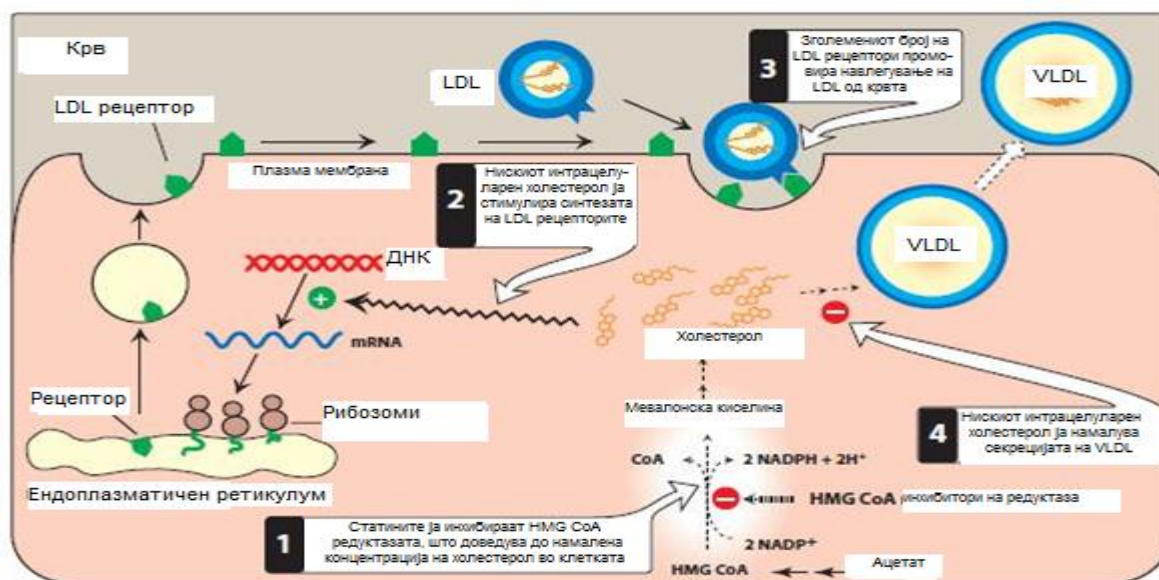
Слика 5. Инхибиција на HMG-CoA редуктазата од статини во црниот дроб

Figure 5. Inhibition of HMG-CoA reductase by statins in the liver

Кај некои пациенти се докажало дека овие лекови ја намалуваат и синтезата на LDL –холестеролот. Статините, покрај значителното намалување на вкупниот и LDL-холестерол, ги намалуваат и триглицеридите во крвта, а се верува дека покрај делувањето на рецепторите за LDL, ја намалуваат и синтезата, односно излачувањето на VLDL-честичките од црниот дроб. Па така, со врзување на ендегената биосинтеза на холестеролот во хепатоцитите, количината на



холестерол се намалува, што заедно со триглицеридите и аполипопротеинот Б, формира VLDL-честички (слика 6).



**(1) Statins block HMG-CoA reductase and thereby reduce cholesterol biosynthesis in the cell (in hepatocytes)**– (1) Статините ја блокираат HMG-CoA редуктазата и со тоа ја намалуваат биосинтезата на холестерол во клетката (во хепатоцитите); **(2). Reduced intracellular cholesterol concentration improves the synthesis of LDL receptors** – (2). Намалената интрацелуларна концентрација на холестерол ја подобрува синтезата на LDL-рецепторите; **(3). The increased number of LDL receptors on the surface of the hepatocyte membrane increases the absorption of cholesterol (LDL particles) from the blood plasma**– (3). Зголемениот број на LDL-рецептори на површината на хепатоцитната мембрана ја зголемува апсорпцијата на холестеролот (LDL-честички) од крвната плазма; **(4). Low levels of intracellular cholesterol reduce the concentration of VLDL particles** – (4). Ниските нивоа на интрацелуларен холестерол ја намалуваат концентрацијата на VLDL-честичките

Слика 6. Механизам на дејствување на статините за намалување на нивоата на LDL

Figure 6. Mechanism of action of the statins to reduce the levels of LDL

Резултатите од повеќекратните клинички испитувања докажале дека намалувањето на триглицеридите во крвта (10-15%) под влијание на статини може да се должи на зголемената елиминација на VLDL и LDL-честичките од крвта, како резултат на зголемена активност на LDL-рецепторот. Точниот механизам со којшто статините предизвикуваат зголемување на липопротеините со голема густина HDL (High Density Lipoproteins), (во просек од околу 5%), сè уште не е целосно разјаснет (Taylor, Huffman & Macedo, 2013; Odden, Pletcher & Coxson, 2015).

Епидемиолошките истражувања, исто така, докажале дека повисоки дози на лекот можат да предизвикаат еквивалентно намалување на ризикот од

миокарден инфаркт и смрт (White and Wang, 2006), а истотака ја намалуваат инциденцата за кардиоваскуларните болести (CVD) за 21 до 43% (Grundy, et al., 2004), со неоспорна ефективност при примарна и секундарна превенција (Pedersen, Kieksus & Berg, 1994; Stein, 2003). Покрај тоа, може да имаат и антиатеросклеротични ефекти (Girotra, Muratka & Migrino 2012; Vasudevan, Hamirani & Jones, 2005) кои позитивно корелираат со намалување на процентот на LDL-холестерол, независно од нивното хиполипидемиско дејство. Бидејќи мевалонат метаболизмот генерира серија изопреноиди од витално значење за различни клеточни функции, од синтеза на холестерол до контрола на клеточниот раст и диференцијација, инхибицијата на HMG-CoA редуктазата има корисни плиотропни ефекти. Како резултат на тоа, се докажало дека статините значително ја намалуваат инциденцата на коронарни промени, како најефикасни хиполипидемични соединенија, и ја намалуваат стапката на морталитет. Научниците веруваат дека статините ги спречуваат CVD преку четири можни механизми, коишто не се целосно разјаснети или докажани: подобрување на функцијата на ендотелните клетки, намалување на воспалителните реакции, одржување на стабилноста на крвните садови и спречување на формирање на коагулум (Bonettia, Lermanc, Napolid & Lermana, 2003) (слика 7).



Слика 7. Дополнителни ефекти од третманот со статини

Figure 7. Additional effects of statin treatment

Клиничките испитувања и екстензивното клиничко искуство укажуваат дека, од една страна, статините како инхибиторите на 3-хидроксил-3-метилглутарил коензим А редуктаза, се најголема група на лекови коишто можат да го намалат холестеролот во крвта, но од друга страна можат да предизвикаат патофизиолошки промени (JAMA, 2013) во мускулното ткиво (зголемување на серумските вредности на креатин киназа) и на хепаталното ткиво, а тоа клинички се манифестира со покачувања на тестови за хепатална функција (Liver function tests-LFT), (Cohen, Anania & Chalasani, 2006). Овие две компликации најчесто се јавуваат (Pasternak, Smith & Bairey-Merz, 2002; Law & Rudnicka, 2006) кога се употребуваат при максимални дози или кога се комбинирани со други лекови за намалување на липидите, како што се фибратите, или во комбинација со лекови коишто го користат истиот ензимски пат како цитохром P450 (CYP), кај постари лица или кај индивидуи со

значителна хепатална и/или ренална дисфункција (Martinez & Nascimento, 2005, Talbert, 2006).

Потенцијалот на статините да предизвикаат оштетување на црниот дроб, иако многу ретко, може да биде клинички значајно и во клиничката практика не треба да се занемарува. Националната липидна асоцијација (National Lipid Association) од извештајот на истражувачка група за безбедноста на статините од 2006 година го потврдува ова и докажува дека кај 3% од пациентите, додека користат статинска терапија, можат да се појават покачени вредности на ензимите на црниот дроб (Cohen et al., 2006). Се докажало дека оваа статин-индуцирана зголемена активност на хепаталните ензими вообичаено се појавувала во првите шест месеци од започнувањето на статинската терапија, ретко била поврзана со симптомите и честопати, покачените вредности спонтано се враќале во нормалните референтни граници или со промена на дозата на статинот (Chalasani, 2005). Во поголемиот дел од испитувањата кај пациентите, статините предизвикале благи покачувања на ALT, а кај 1-3% од пациентите, покачувањата на ALT биле повеќе од трипати над горната референтна вредност при две или повеќе одредувања, што вообичаено исто така било поврзано со дозата на лекот (Chalasani, 2005). Други клинички студии докажале дека хепатотоксичноста првенствено се појавувала во текот на првите три месеци од терапијата и вообичаено зависела од дозата, но во некои студии се докажале ретки епизоди на тешко оштетување на црниот дроб 3-4 месеци по започнувањето на статинската терапија. Спротивно на ова, во мета-анализа на 35 рандомизирани испитувања се докажал висок ризик од покачување на аминотрансферазите во текот на користењето статинска терапија (Kashani et al., 2006).

Некои студии не наоѓаат значајна разлика во инциденцата на постојано покачени ензими на црниот дроб меѓу статините и плацебо контролирани

испитувања (Downs et al., 1998; Lancet, 1994; HPSCG, 2002). Клиничката важност од ова не е јасна бидејќи често пациентите имаат други истовремени фактори коишто можат да ја зголемат активноста на аминотрансферазите. Некои студии сугерираат дека дел од варијабилноста во одговорот и несаканите ефекти од статините можат да бидат поврзани со генетски разлики во стапката на метаболизмот на лековите (Mulder et al., 2001) поради состојби како што се: употреба на други лекови (интеракцијата на два лека кои имаат ист метаболички ензим) и повисоки дози на статини. Познавањето на најчесто вклучените агенси и следењето на вредностите на хепаталните ензими се од суштинско значење за дијагнозата и за продолжување со статинот како ефикасна терапија за намалување на концентрацијата на холестеролот во крвта.

### **1.2.1. Хепатотоксичност од статини**



Хепатотоксичноста од статините се манифестира со цитоморфолошки и биохемиски промени коишто варираат во зависност од класата на лекот и вклучува ефекти врз ензимот CYP450, оштетување на транспортните протеини на жолчната киселина, имунолошки посредуван воспалителен одговор од лекот или од неговите метаболити, имуно-посредувана апоптоза со туморска некроза и оксидативен стрес поради интрацелуларно оштетување.

Првичните испитувања на статини кај животни покажале дека многу високи дози на статини можат да предизвикаат хепатотоксичност, но типичните терапевтски дози на лекот не биле поврзани со значајно оштетување на црниот дроб (Horsmans, Desager & Harvengt, 1990). Во еден извештај од тогашниот токсиколошки биомониторинг, било потврдено дека високи дози на ловастатин предизвикале значителна хепатоцелуларна некроза кај зајаци. Вакво оштетување на црниот дроб било забележано и кај морско прасе изложено на високи дози на симвастатин. Сепак, во овие испитувања кај луѓето, било докажано дека хепатоцелуларната некроза од статини е исклучително ретка (Alonso et al., 1999).

Првите биомониторинг истражувања со примена на фармакодинамските биомаркери за фармаколошка активност и за хепаталниот метаболизам на статините, покажале дека тие зависеле од нивната молекуларна структура и од физичките својства, како што се: липофилност, растворливост и апсорпција. Било докажано дека симвастатин, ловастатин, флувастатин и аторвастатин се метаболизираат со ензимот CYP450, додека правастатин, росувастатин и питавастантин било потврдено дека остануваат речиси непроменети со какви било хепатални метаболитички процеси.

Точниот механизам за тоа како статините предизвикуваат покачување на ALT и AST е непознат, а тоа придонесува тешко да се предвидат хепаталните ефекти на одделни статини врз основа на нивните карактеристики. Во повеќе клинички испитувања се докажало дека целокупната токсичност на статините (врз мускулите, црниот дроб итн.) не била директно поврзана со степенот на намалување на LDL, тоа е во корелација со дозата на лекот (Alsheikh-Ali, Maddurkuri, Han & Karas, 2007), истовремена примена на инхибитори на ензимот CYP450 или индуктори, комбинации на промени во липидите, оштетена бубрежна функција и кај постари пациенти (Parra & Reddy, 2003).

### **1.2.2. Ензими на црниот дроб како биомаркери при биомониторинг за хепатотоксичност на статините**

Статините како инхибитори на HMG-CoA редуктаза, можат да го намалат холестеролот во крвта, но од другата страна предизвикуваат патофизиолошки промени во хепаталното ткиво, со зголемување на вредностите на хепаталните ензими. Затоа, за да се процени нивната безбедност и цитотоксичните ефекти во организмот (Argo, Loria, Caldwell & Lonardo, 2008), во последниве години, со

развојот на клиничката ензимологија (Данијела и Марија, 2015), дојде до нагло зголемување на можноста за биомониторинг на хепаталните ефекти и систематска хепатотоксичност во текот на користење на статинската терапија. Со многу сензитивни и специфични ензимски тестови, можно е многу рано да се откријат многу патолошки процеси, коишто се отчитуваат како промена во пропустливоста на клеточната мембрана. Имено, како последица од зголемената пропустливост на клеточната мембрана, се зголемува нивото на ослободување на ензимите од оштетените клетки, а со тоа расте и нивната концентрација во серумот на пациентот. Одредувањето на активноста на разните ензими во серумот може да се дијагностицира со одредени биохемиски маркери, како лабораториските тестови за серумски аминотрансфери.

Во истражувања од хуман биомониторинг со мета-анализи на рандомизирани плацебо-контролирани испитувања се потврдува дека ниските до умерени дози на статини не биле поврзани со клинички значајна, т.е. зголемена активност на ALT трипати над горната референтна вредност (Wlodarczyk, Sullivan & Smith, 2008; De Denu, Spinler, Miller & Peterson, 2004) и се со процентната стапка <1% при почетна и средна доза на лекот. Оваа стапка се зголемува од 2 до 3% кај оние пациенти коишто примале 80 mg дневно од кој било статин. Максималните препорачани дози за ловастатин, правастатин, симвастатин, аторвастатин и росувастатин биле поврзани со благи, но забележителни зголемувања на активноста на аминотрансфери (Bradford, Shear & Chremos, 1994; Cannon, Braunwald & McCabe, 2006).

Во еден извештај врз основа на податоци од 49 испитувања, којшто бил спроведен на 14.000 пациенти, имало перзистентни покачувања на хепаталните ензими > 3 пати над горната референтна вредност кај 0,1%, 0,6% и 0,2% од пациентите кои користеле аторвастатин 10 и 80 mg и плацебо група (Newman, Tsai & Szarek, 2006). Овие зголемени вредности на хепаталните ензими најчесто биле минливи и спонтано се враќале во референтната вредност, дури и со продолжено користење на статините и без намалување на дозата (McKenney, Davidson & Jacobson, 2006). Иако постои мала поврзаност со покачувањето на LFT, податоците од клиничките испитувања докажале дека зголемувањето било поврзано со дозата, а не со нивото на намалување на LDL (Bays, 2005; Jacobson, 2006).

Во клинички истражувања со употребата на биомаркери било потврдено дека акутната хепатална инсуфициенција поврзана со статини е исклучително ретка, ваква инциденца била констатирана кај ловастатин, приближно 1 на 114.000 пациенти годишно, речиси слично на идиопатската акутна црнодробна инсуфициенција кај општата популација 1 на 130.000 пациенти годишно (Dujovne, 2002; Onofrei, Butler, Fuke & Miller, 2008). Во овој контекст, во периодот од 1987 до 2000 година, во САД, статините биле поврзани со фулминантна хепатална инсуфициенција кај 3 од 51.741 случај кај пациенти со трансплантиран црн дроб (Russo et al., 2004). FDA во истиот период пријавила

30 случаи на статин-индуцирана хепатална инсуфициенција, еднаква на приближно еден случај на еден милион лица годишно коишто користат статини (Law, Wald & Rudnicka, 2003).

Резултатите од биомониторинг испитувања коишто ја испитуваат поврзаноста меѓу статинска терапија и оштетувањата на црниот дроб се неконзистентни, во повеќето случаи, придобивките од статините ги надминале потенцијалните хепатотоксични ризици (Björnsson, 2017). Во прилог на ова, Американската управа за храна и лекови (Food and Drug Administration – FDA) советува да биде следена функцијата на црниот дроб со биохемиски маркери, како серумските аминотрансферази, пред започнување на третман со статини, 12 недели по започнувањето, а потоа еднаш годишно или дури и порано, ако тоа е индицирано или при промена на дозата (Weismantel, 2001), (табела 3).

Табела 3. Поврзаноста меѓу статинска терапија и оштетувањата на црниот дроб

Table 3. The relationship between statin therapy and liver damage

<b>Кога да се следи функцијата на црниот дроб кај пациенти кои се лекуваат со статини?</b> When to monitor liver function in patients treated with statins?	
<b>Кога да се проверат ALT/AST?</b> When to check ALT / AST?	<b>Што да се направи?</b> What to do?
<b>Иницијација на третман или зголемување на дозата</b> Initiation of treatment or increase in dose	<b>Започнување со зголемување на дозата на статини доколку ALT и AST се &lt;3 пати од ULN</b> Begin/increase dose of statin if ALT and AST are <3 times the ULN
<b>12 седмици по започнувањето на статинска терапија</b> 12 weeks after initiation of statin therapy	<b>Да се прекине со статинот (или намалување на дозата), ако ALT и AST се &gt; 3 пати од ULN</b> Discontinue the statin (or lower the dose) if ALT or AST are >3 times the ULN
<b>Долгорочно (годишно или периодично)</b> Long-term (annually or “periodically”)	
ALT – аланин аминотрансфераза; AST – аспартат аминотрансфераза; ULN – повисока граница од нормалната	

Овие препораки се засноваат само на експертско мислење, бидејќи повеќето податоци сугерираат дека значајно оштетување на црниот дроб од статини е многу ретко, но сепак, потребно е да се одредуваат хепаталните ензими ако се појават симптоми коишто укажуваат на хепатотоксичност (на пример, невообичаен замор или слабост, губење на апетитот, абдоминална болка, темна боја на урината или пожолтување на кожата или склерата). Доколку кај пациентот вредностите за ALT се  $>3$  пати над горната референтна вредност, во комбинација со зголемени концентрации на билирубин, двојно повеќе над горната референтна вредност, тоа преставува индикатор за загрижувачка хепатотоксичност (Reuben, 2004), којашто ја поттикнува потребата од повеќе тестови за да се утврди етиологијата.

Макроскопските и особено хистопатолошките испитувања и одредувањето на дополнителни клинички биохемиски параметри овозможуваат потврда на хепатотоксичноста. Пред да се потврди дека покачените ензими на црниот дроб се должат на статинот, во меѓувреме, пациентот би било потребно да се префрли од една статинска група во друга. Доколку не се најде алтернативна етиологија (Rockville, 2012) и се јави сериозно оштетување на црниот дроб со клинички симптоми и/или хипербилирубинемија или жолтица за време на третманот, терапијата треба да се прекине.

Лекарите мораат да бидат внимателни при идентификување на оштетувањето на црниот дроб поврзано со статини, бидејќи раното откривање може да ја намали сериозноста на хепатотоксичност ако лекот и дозата се променат. Достапната литература и ревидираните податоци од многу клинички студии укажуваат дека статините се добро толерантни и нема убедливи докази дека тие би можеле да предизвикаат значително оштетување на црниот дроб. Забележано е дека инциденцата на зголемување на аминотрансферазите е слична кај сите статини, доколку се користат во високи дози и подолго време, и покрај различните фармакокинетички карактеристики. Подоброто разбирање на механизмите што стојат зад негативните ефекти на статините, вклучувајќи и увид во фармакокинетските својства, кај лекарите ќе го минимизираат стравот од употреба на статини.

### **1.2.3. Значењето на хепаталните ензими како биомаркери кај пациенти со безалкохолни масни заболувања на црниот дроб со статинска терапија**

Безалкохолните масни заболувања на црниот дроб (NAFLD) се најчестата причина за зголемени вредности на аминотрансферазите и во моментот се најчеста форма на хронична болест на црниот дроб. Повеќето пациенти со овие клинички ентитети се изложени на зголемен ризик за CVD и претставуваат целна група за примена на статини, бидејќи тие се поврзани со болести коишто значително го зголемуваат севкупниот кардиоваскуларен ризик

како последица од придружните состојби како дислипидемија, дебелина и дијабетес мелитус тип 2 (Ekstedt et al., 2007). Зголемената активност на хепаталните ензими (AbuRajab & Kaplan, 2010) кај оваа група на пациенти е главната причина за дилема кај многу лекари за да започнат со статинска терапија. Меѓутоа, мониторингот и анализите покажуваат дека кај оваа група пациенти може да биде пропишана статинска терапија. Во ретроспективно кохортно проучување спроведено неодамна, биле следени 93.106 пациенти со претходно постоечко заболување на црниот дроб, каде што експозицијата на статините била поврзана со помал ризик од несакани хепатални исходи (Avins, Manos & Ackerson, 2008). Во други две проучувања, за да ги евалуираат статините се следеле три групи на пациенти: пациенти со покачени и со нормални вредности на ALT, коишто користеле статини, и пациенти со покачени вредности на ALT кои не користеле статини. И во двете студии се докажало дека зголемената активност на хепатални ензими не го зголемуваат ризикот од статин-индуцирана хепатотоксичност (Chalasani et al., 2004; Vuppalanchi, Teal & Chalasani, 2005). Во друго 36-неделно испитување на статини кај 326 пациенти по случаен избор со добро компензирана хронична болест на црниот дроб, наспроти плацебо група, било утврдено дека процентната стапка на покачување на вредностите на ALT во статинската група била ниска и не се разликувала од онаа на плацебо групата (Lewis et al., 2007). Слично на тоа, во подгрупа кај пациенти со претходно постоечки абнормалности на црниот дроб коишто учествувале во голем статински тест, не биле забележани значајни разлики во покачувањето на вредностите на ALT меѓу пациентите со статини и плацебо групите (Pfeffer, Keech & Sacks, 2002).

Резултатите од биомониторингот со коишто била опфатена оваа група на пациенти докажале дека со соодветно следење на вредностите на хепаталните ензими, статините можат да бидат пропишани ако нивната употреба е јасно индицирана, бидејќи нивната зголемена активност во серумот често е секундарна и е последица од придружните состојби.

#### **1.2.4. Тестови за функцијата на црниот дроб како биомаркери при биомониторинг кај пациенти лекувани со статини, со хроничен хепатитис и црнодробна цироза**

Биомониторингот, во корелација со развојот на молекуларната биологија и биохемијата, не само што ја докажува безбедноста на статините кај пациенти со различни форми на заболување на црниот дроб, туку доказите сугерираат дека хиперлипидемичните пациенти хронични носители на инфекции со хепатитис Б и Ц можатда имаат голема корист од статинската терапија.

Ефикасноста на статините кај хиперлипидемичните пациенти со хроничен хепатитис, со следење на биохемиските параметри во корелација со други

патофизиолошки промени во организмот, била набљудувана кај 830 хиперлипидемични пациенти со хепатитис Ц, втекот на 12-месечен период (Khorashadi, Hasson and Cheung, 2006). Во оваа студија, пациентите биле поделени во три групи: 166 биле позитивни на хепатитис Ц, 332 биле негативни на хепатитис Ц, сите биле на едногодишен третман со статини и 332 биле пациенти позитивни на хепатитис Ц кои не примале статини. Промената на биохемиските параметри за LFT била забележана во текот на годината пред

статинска терапија и една година по третманот. Резултатите покажале дека пациентите во групата што примала статини имале повисока инциденца на благи до умерени зголемувања на вредноста на LFT, но нетретираната група имала најголема инциденца на тешки патолошки вредности. Исто така, меѓу хепатитис Ц позитивните и негативните пациенти, немало значителни разлики во однос на процентната стапка на зголемување на вредноста на ензимите на црниот дроб. Заклучокот бил дека терапијата со статини била безбедна кај пациенти со хепатитис Ц со хиперлипидемија.

Во друго ретроспективно кохортно истражување, во коешто биле мониторирали 13.492 пациенти кои користеле ловастатин (Avins, Manos & Levin, 2006) и 320 пациенти кои користеле правастатин (Lewis et al., 2006), немало доволно докази за зголемена хепатотоксичност кај оние со хронично заболување на црниот дроб, вклучувајќи ги и инфекциите со хепатитис Б и Ц. Овие резултати покажале дека придобивки од третманот со статини може да се добијат дури и кај популација за којашто се смета дека е изложена на ризик за несакани дејства.

Кардиоваскуларните болести се една од водечките причини за смрт кај пациенти со црнодробна цироза (20% кај црнодробна цироза, наспроти 12% кај општата популација). Иако статините го намалуваат ризикот од кардиоваскуларни промени, постои дополнителна загриженост за хепатотоксичност бидејќи пациентите со хронично заболување на црниот дроб, особено црнодробна цироза, се изложени на ризик од намалување на хепаталниот клиренс, покрај тоа и фармакокинетиката на статини може значително да се промени од цирозата. Меѓутоа, сепак, новите податоци од биомониторингот со контролирани испитувања по случаен избор и опсервациски студии докажале дека употребата на статини кај хронично заболување на црниот дроб и кај цирозата е безбедна. Во клинички истражувања спроведени неодамна, кај пациенти со цироза била испитана терапијата со статин, при што не била поврзана со зголемена смртност и било докажано дека може да ја одложи декомпензацијата (Kumar, Grace & Qamar, 2014). Во ретроспективен преглед на пациенти со трансплантација на црн дроб, била проценета инциденцата на негативни ефекти со статини, при што била пријавена ниска инциденца на несакани дејства без тешки компликации и промени во вредноста на LFT (Martin et al., 2008). Овие клинички испитувања ја поддржале употребата на статини кај пациенти со висок кардиоваскуларен



ризик, чишто покачени вредности на аминотрансферазите немале клиничка релевантност или биле последица од хроничните состојби на црниот дроб. За секој пациент, одлуката на лекарот за продолжување на статинската терапија треба да се темели на индивидуална проценка на ризиците и придобивките од неа.

### **1.3. Мониторинг на креатин киназа кај пациенти со статинска терапија**

Миалгијата (мускулна болка без промени на СК) е прилично чест бениген несакан ефект кај пациенти со статинска терапија (Bruckert, Hayem & Dejager, 2005; Sinzinger, Wolfram & Peskar, 2002). Општо земено, таа е лесна и се смирува со континуирана терапија. Посериозен, но редок несакан ефект на статинската терапија е миопатијата, која е дефинирана како мускулна болка, осетливост или слабост со покачување на СК десетпати над горната референтна вредност. Кога статините се препишуваат како монотерапија, инциденцата на миопатија е 0,1 – 0,5%. Доколку миопатијата не се препознае и терапијата со статин продолжи, може да се појави некроза на мускулните клетки со можна последователна миоглобинурија. Ова може да резултира со опасна по живот рабдомиолиза. Ризикот од миопатија и рабдомиолиза се зголемува десетпати кога статините се администрираат со лекови коишто се метаболизираат преку заедничкиот ензимски пат.

Следењето на вредностите на СК помага да се исклучи инфламацијата на мускулите и да се овозможи безбедно продолжување на третманот. Препорачливо е да се следат пациентите со знаци и симптоми на мускулна болка, чувствителност или слабост, особено за време на првите месеци на статинска терапија и при последователни зголемувања на дозата (Merck, Sharp & Dohme, 2003; Pfitzer Laboratories, 2003). Одредувањата на активноста на СК се препорачува кога ќе се појават симптоми. Пациентите со дополнителни фактори на ризик, на пример, дијабетес, постара возраст, пациенти со хипотироидизам, оштетен црн дроб или со бубрежна болест (Gotto, 2003; ADRAC, 2004) заслужуваат почест мониторинг, бидејќи тие можат да бидат повеќе изложени на ризик од рабдомиолиза (Merck, Sharp & Dohme, 2003). Бидејќи мускулните симптоми поврзани со статините (SAMS) се една од главните причини за непридржување кон статинската терапија и/или нејзино прекинување, што придонесува за негативни кардиоваскуларни исходи, Европското здружение за атеросклероза (European Atherosclerosis Society-EAS) ја анализира тековната патофизиологија на миопатите поврзани со статини и обезбедува насоки за дијагностицирање и управување со SAMS. Во табела 4 се прикажани дефиниции на мускулни симптоми поврзани со статините, предложени од EAS Консензус панел.

Табела 4. Дефиниции за мускулните симптоми поврзани со статините, предложени од ЕАС Консензус панел

Table 4. Definitions of statin-associated muscle symptoms proposed by the EAS Consensus Panel

<b>Асимптоматски</b> Asymptomatic	<b>СК &lt;4пати од ULN; нема мускулни симптоми</b> CK <4 x ULN;no muscle symptoms
<b>Миалгија</b> Myalgia	<b>Нормален СК; симптоми или покачена СК &lt;4 пати од ULN; симптоми</b> Normal CK;symptoms or elevated CK (<4x ULN);symptoms
<b>Миозитис</b> Myositis	<b>СК &gt;4 пати од ULN &lt;10 пати; ± симптоми или СК &gt;10 пати од ULN&lt;50 пати; ± симптоми</b> CK >4x ULN<10x; ± symptoms or CK >10 x ULN <50x; ± symptoms
<b>Рабдомиолиза</b> Rhabdomyolysis	<b>СК &gt;10 пати од ULN, мускулни симптоми + оштетување на бубрежната функција или СК &gt;50 пати од ULN</b> CK >10x ULN, muscle symptoms + renal function impairment or CK >50x ULN
СК – креатинин киназа; ULN – повисока граница од нормалната	

Панелот предлага да се идентификуваат SAMS со симптоми типични за статинска миалгија (т.е. мускулни симптоми и ниедна друга причина за мускулна повреда) и нивно привремено прекинување или максимално толерирана доза на статин, во комбинација со терапии за намалување на липидите кои не се статини, за да се постигне препорачаното намалувања на LDL.

Механизмот на мускулната болка предизвикана од статините не е целосно јасен, но истражувањата докажале дека може да биде предизвикан од намалената синтеза на мевалонска киселина од статинските лекови, што доведува до намалено производство на енергија, а тоа пакможе да доведе до повреда на мускулите. Претклиничките студии докажуваат дека статините, исто така, ја намалуваат и митохондријалната функција, го намалуваат производството на енергија и ја менуваат деградацијата на мускулните протеини, со што се обезбедува потенцијална врска меѓу статините и мускулните симптоми. Ризикот од статин-индуцирана миопатија се зголемува со: употреба на високи дози на статини, истовремена употреба на фибрати или ниацин, истовремена употреба на инхибитори на хепаталниот цитохром P450 (CYP3A4), не ограничувајќи се на циклоспорин, макролидни антибиотици, антидепресиви и сок од грејпфрут; постари пациенти и пациенти со оштетена бубрежна функција. За понатамошно разбирање на основните патофизиолошки механизми на мускулните симптоми поврзани со статини, коишто би можеле да понудат иден терапевтски потенцијал, неопходен е контролирани генетски биомониторинг.



## 2. Цел на специјалистичкиот труд (The goal of the specialized labor)

Ова истражување има четири главни цели од коишто произлегуваат задачите и активностите преземени за нивна реализација. Целите се следните:

- Значење на биомониторингот кај пациенти со хронична срцева слабост, како и кај пациенти со дислипидемија коишто подолго време се со пропишана статинска терапија;
- Да се укаже на значењето на различни молекуларни, клеточни и биохемиски биомаркери, какошто се серумските аминотрансферази, но и други ензими, како на пример креатин киназата, како потенцијални предвидувачки параметри преку коишто може да се следи хепатотоксичноста и мускулните симптоми поврзани со статини;
- Да се објаснат и да се елаборираат лабораториските методи за нивно испитување и валидизација;
- Да се направи корелација меѓу најчесто користените биомаркери со коишто се потврдува цитотоксичноста на одредени хемиски агенси.

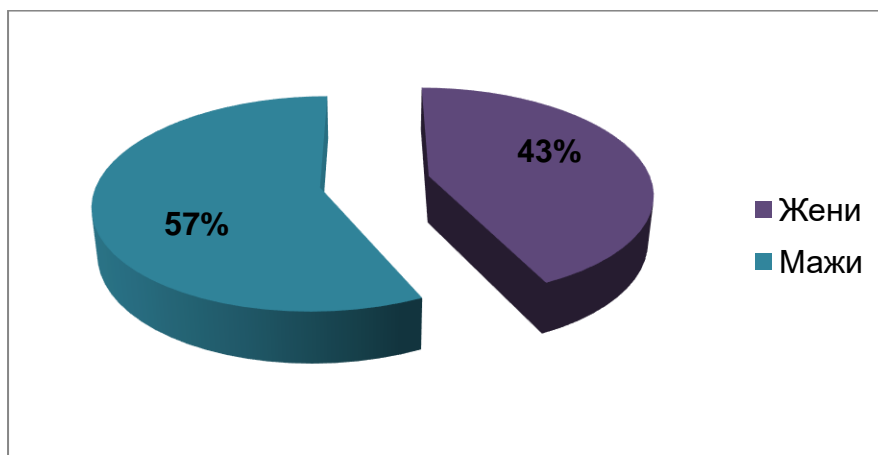
### 3. Материјал и метод за работа (Materials and methods of work)

За изработката на овој специјалистички труд, користени се резултати од биохемиско-лабораториски испитувања од ЈЗУ Универзитетска клиника за клиничка биохемија, Клинички центар Мајка Тереза – Скопје, и опфатен е временскиот период од јануари 2017 до декември 2018 година. Во трудот беа опфатени 58 пациентина возраст од 36 до 93 години, од кои 25 беа жени (43%), а 33 (57%) беа од машки пол (таб. 5, сл. 9).

Табела 5. Полова структура на испитаниците

Table 5. Gender structure of respondents

Пол/Gender	Број на испитаници (N)	%
Мажи/Men	33	57%
Жени/Women	25	43%
Вкупно /Total	58	100



Слика 9. Графички приказ на пропорциската застапеност на мажи и жени пациенти.

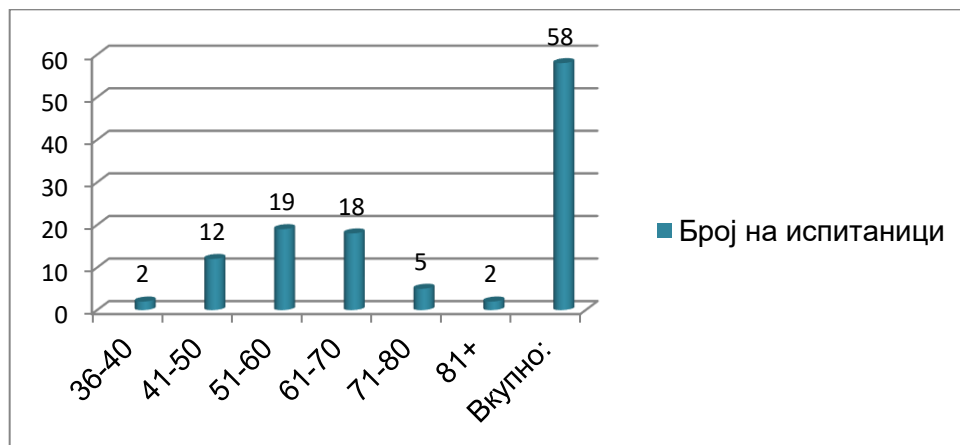
Figure 9. Graphical display of the proportional representation of male and female patients.

Во поглед на возраста, просечната возраст на вкупниот број испитаници изнесуваше  $59,41 \pm 11,40$  години. Мажите беа со просечна возраст од  $61,42 \pm 11,29$  години, а жените беа на возраст од  $56,76 \pm 11,23$  години. Нема значајност на разликата во однос на средните вредности на возраста меѓу мажите и жените кои се вклучени во истражувањето, (таб. 6, сл. 10).

Табела 6. Старосни групи на пациентите

Table 6. Patients by age groups

Пол/ Gender	Возраст/ Age		
	[mean $\pm$ SD]	Мин/min	Макс/max
Жени/ Women	$61,42 \pm 11,29$	36	72
Мажи/ Men	$56,6 \pm 11,23$	44	93
Вкупно /Total	$56,76 \pm 11,23$	36	93



Слика10. Структура според возраст

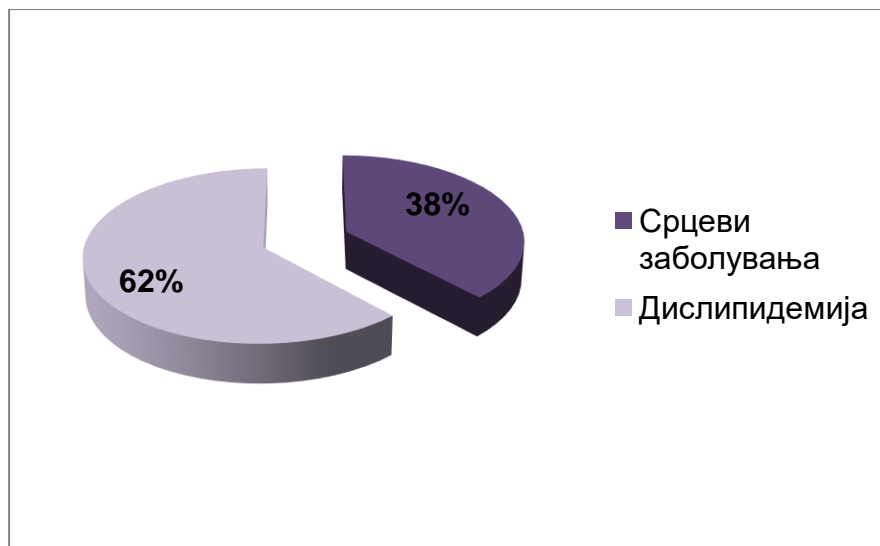
Figure 10. Structure by age

Во студијата беа вклучени пациенти со хронична срцева слабост 22 (38%), како и 36 пациенти со дислипидемија (62%), коишто беа лекувани со најчесто препишуваните статини (аторвастатин и росувастатин), (таб. 7, сл. 11). Аторвастатин беше пропишан со различни дози од 10 mg кај 7 пациенти (12%), 20 mg кај 14 пациенти (24%), 40 mg кај 7 пациенти (12%), а росувастатин беше препишан со дози од 10 mg кај 9 пациенти (15,5%), 20 mg кај 13 пациенти (22,5%), 40 mg кај 8 пациенти (14%), еднаш дневно, пред спиење, според проценката на кардиологот (сл. 12).

Табела 7. Поделба по заболувања

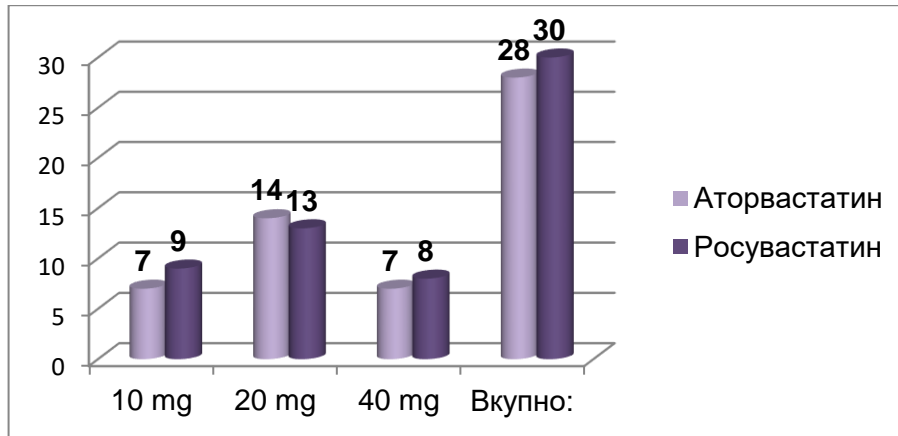
Table 7. Division by disease

Заболување/ Disease	Број на испитаници N	(%)
Срцеви заболувања/ Cardiac disease	22	38%
Дислипидемија/ Dyslipidaemia	36	62%
Вкупно/Total	58	100%



Слика 11. Графички приказ на пропорциската застапеност на заболувањата

Figure 11. Graphic representation of probation of disease



Слика 12. Терапија со статини според дозирање кај испитаниците  
Figure 12. Treatment with statins according to dosing in subjects

Хепатотоксичните ефекти беа следени преку евалуација на биохемиските маркери, главно хепатални ензими (серумски аминотрансферази), како важни индикатори или параметри за проценување на хепатотоксичниот ефект, како и други ензими (креатин киназа), за да се исклучи инфламацијата на мускулитеи да се овозможи безбедно продолжување на лекувањето со статини. Дислипидемијата кај субјектите беше дефинирана со одредување на комплетен липиден статус.

Истражувањето е спроведено со целосно почитување на доверливост (тајност) на личните и медицинските податоци на пациентот и е во согласност со прописите за чување професионална и деловна тајна, заштита на личните податоци, како и со принципите на добра клиничка пракса.

За комплетната анализа на биохемиските параметри, биолошкиот материјал беше венска крв, земен во стандардни епрувети (сл. 12). Пациентите мораа да се придружуваат кон општите правила на подготовка за земање крв, а анализите беа направени во зададениот рок. Примерокот за анали за задолжително беше земен наутро, по ноќно гладување, 12 часа по последниот оброк. Во преаналитичката фаза, пред да се земе примерок, пациентите беа впишани во лабораторискиот информативен систем (LIS), за да им се додели единствен баркод со којшто се означува епруветата (сл. 13). На тој начин се намалува можноста за замена на примерокот, т.е. се овозможува сигурна идентификација на примерокот во текот на анализата. По земањето примерок, тој беше доставен во приемното одделение. Потоа следуваše процесот на

центрифугирање, 15 минути со центрифугална сила (g) од 1000 до 2000 g, со што се врши одвојување на серумот од крвниот коагулум. Вака подготвените примероци, на соодветни носачи беа внесени директно во автоматскиот анализатор.



Слика 12.Земање биолошки материјал  
Figure 12. Taking a blood sample



Слика 13. Лабораториски примероци означени со баркодови  
Figure 13. Laboratory samples marked with barcodes

Аналитичката фаза се одвиваше на биохемиски анализатор Cobas Integra 400Plus (Roche Diagnostics), којшто претходно беше истражиран и контролиран. Апаратот Cobas Integra400 Plus претставува комплетно автоматизиран биохемиски анализатор од затворен тип (сл.14). Биохемискиот анализатор автоматски ја пресметува активноста во секој примерок кој е предмет на анализа.



Слика 14. Биохемиски анализатор Cobas Integra 400 Plus-Roshe Diagnostics

Figure 14. Biochemistry analyzer Cobas Integra 400 Plus-Roshe Diagnostics

Одредувањето на активноста на ензимите AST, ALT, CK и концентрацијата на липидните параметри беа изработени со стандардизиран ензимско-колориметриски метод според Интернационалната федерација за клиничка хемија (IFCC – International Federation of Clinical Chemistry).

**Принципот за одредување на концентрација на комплетниот липиден статус вклучува:** стандардни методи во серум. Овие методи се аплицирани на автоматскиот биохемиски анализатор Cobas Integra 400 Plus.

**Референтни вредности:** Триглицериди до 2 mmol/L; вкупен холестерол до 5,5 mmol/L; HDL 0,9 – 2,0 mmol/L; LDL 2,2 – 3,7 mmol/L.

**Принципот за одредување на активноста на AST вклучува:**

AST ја катализира реакцијата меѓу L-аспартат и  $\alpha$ -кетоглутарат, при што се добива оксалацетат. Создадениот оксалацетат е редуциран од NADH во реакција што се катализира од малат дехидрогеназа (MDH) за да се формира L-малат и наникотинамид-аденин-динуклеотид (NAD). Стапката на оксидација на NADH е директно пропорционална на каталитичката AST активност. Се одредува со мерење на намалувањето на апсорпцијата на 340 nm.

**Референтни вредности:** AST 10-34 U/L.

**Принципот за одредување на активноста на ALT вклучува:**

ALT ја катализира реакцијата меѓу L-аланин и 2-оксоглутарат. Формираниот пируват се намалува со NADH во реакција којашто се катализира од лактат дехидрогеназа (LDH) за да се формира L-лактат и NAD<sup>+</sup>. Стапката на NADH

оксидацијата е директно пропорционална на каталитичката ALT активност. Се одредува со мерење на намалувањето на апсорпцијата на 340 nm.

**Референтни вредности:** ALT 10-45 U/L.

**Принципот за одредување на активноста на СК вклучува:**

Креатин фосфат + ADP СК креатин + ATP

Глукоза + ATP хексокиназа глюкоза-6-фосфат + ADP

Глукоза-6-фосфат + NAD<sup>+</sup> глукоза-6-фосфат дехидрогеназа глюконат-6-фосфат + NADH<sup>+</sup>

Стапката на формирање на NADPH е директно пропорционална со каталитичката активност на СК. Се одредува со мерење на порастот на апсорбансата на 340 nm.

**Референтни вредности: СК 24-173 U/L**

**Статистички методи:**

Сите собрани податоци од интерес се табеларно и графички прикажани:

- Аритметичката средина е пресметана со збир на сите износи и нивна поделба со бројот на износи;
- Структурата на нумеричките серии е анализирана со помош на мерките на централна тенденција (просек) и мерките на дисперзија (стандардна девијација);
- Тестирање на значајност на разлики меѓу две аритметички средини кај независните примероци е направено со Студентов (Student) тест;
- За пресметка на ИТТ (BMI), потребни се телесната тежина и висината на пациентите. Индексот на телесната маса се пресметува со делење на масата на субјектот со квадратот на неговата или нејзината висина, обично изразени во метрички единици: 
$$\text{ИТТ} = \frac{\text{маса (kg)}}{\text{висина (m}^2\text{)}}$$



#### 4. Резултати и дискусија (Results and discussion)

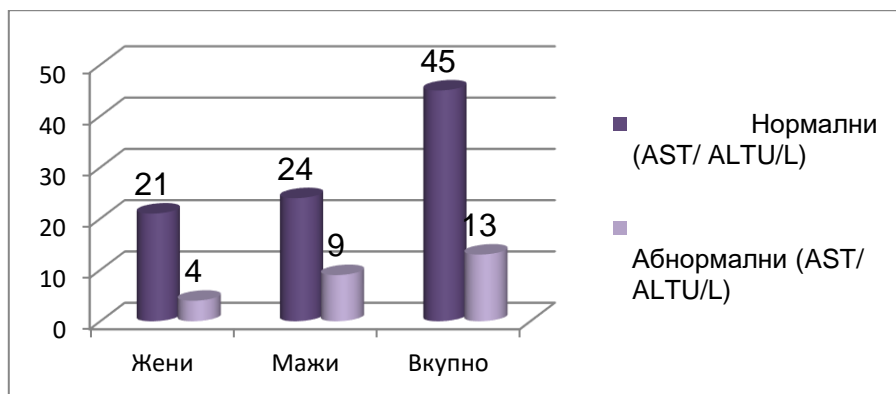
Како што претходно е напоменато, во истражувањето беа вклучени 58 пациенти со хронична срцева слабост, како и пациенти со дислипидемија. Кај сите пациенти беа одредувани: концентрација на вкупниот холестерол (TC) (средна вредност = 5,6mmol/L), триглицериди (TG) (средна вредност = 3,2mmol/L), липопротеинскиот холестерол со ниска густина (LDL-C) (средна вредност = 2,4 mmol/L), и липопротеински холестерол со висока густина (HDL-C) (средна вредност = 1,2mmol/L).

Со индиректен биомониторинг, преку евалуација на биохемиските маркери, главно хепатални ензими (AST/ ALTU/L), беа следени можните хепатотоксични ефекти од фармацевтски агенси, како што се статините. Од резултатите на одредуваната серумска активност на AST/ ALTU/L, прикажани во табела 9, беше утврдено дека 45 (77,6%) од испитаниците имаа нормални вредности, но 13 (22,4%) од нив имаа зголемена активност на ензимите. Од вкупниот број пациенти со нормални вредности за AST/ALTU/L, 21 беа жени и 24 мажи, додека од вкупниот број со зголемена активност на хепаталните ензими, 4 беа жени и 9 мажи (сл.15).

Табела 9. Вкупен број, полова припадност и процент на пациенти со нормална и абнормална активност на аминотрансферази (AST/ ALTU/L)

Table 9. Total number, sex membership and percentage of patients with normal and abnormal activity on the aminotransferase (AST ALT /L)

Пол/ Gender	Број на испитаници (N)	
	Нормални/Normal Ензими/Enzymes (AST/ ALTU/L)	Абнормални/Abnormal Ензими/Enzymes (AST/ ALTU/L)
Жени/ Women	21 (46,66%)	4 (30,8%)
Мажи/ Men	24 (53,33%)	9 (69,2%)
Вкупно/Total	45 (77,6%)	13 (22%)
ALT – аланин аминотрансфераза; AST – аспартат аминотрансфераза.		



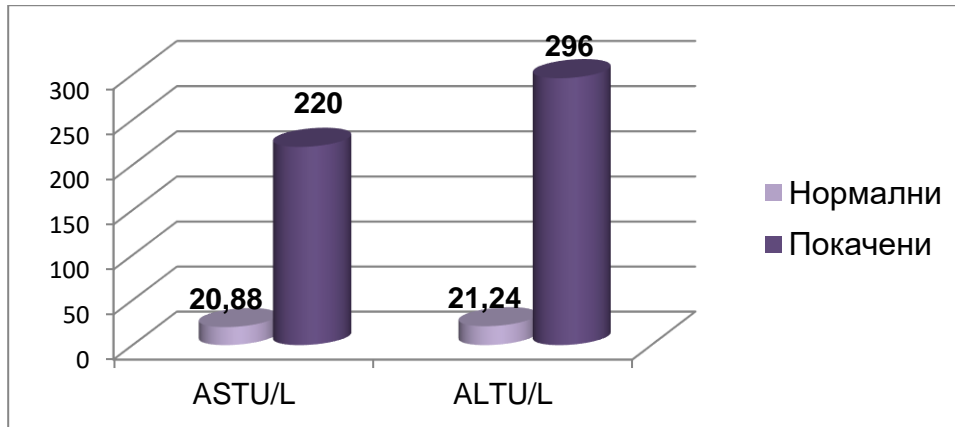
Слика 15. Приказ на пациенти со нормални и абнормални аминотрансферази  
Figure 15. Display of patients with normal and abnormal aminotransferases

Како што кажавме претходно, главните биохемиски биомаркери за мониторинг на можните хепатални ефекти од статини се: AST и ALT. Добиените резултати според статистичката пресметка аритметичка средина се прикажани во табела 10, слика 16. Од прикажаните резултати можеме да кажеме дека повеќето пациенти што беа вклучени во истражувањето беа со нормална вредност на хепаталните ензими, просечната вредност за AST изнесуваше  $20,88 \pm 5,95 \text{ U/L}$ , min/max 13/37, додека за ALT истата беше  $21,24 \pm 6,97 \text{ U/L}$ , min/max 11/37. Кај пациентите, пак, коишто беа со зголемени вредности на хепаталните ензими беше утврдено дека AST изнесуваше  $220 \pm 304,8 \text{ U/L}$ , min/max 43/995, додека за ALT истата беше  $296 \pm 336,2 \text{ U/L}$ , min/max 49/1019.

Табела 10. Приказ на нормалните и покачените вредности од одредената активност на хепаталните ензими меѓу испитаниците

Table 10. Display of the normal and elevated values of the specific activity of the liver enzymes among the examinees

Тест/Tests	Нормални/ Normal	Покачени/ Raised	Нормални/ Normal Мин/Макс Min/Max	Покачени/ Raised Мин/Макс Min/Max
<b>ASTU/L(10-34)</b> mean $\pm$ SD	20,88 $\pm$ 5,95	220 $\pm$ 304,8	13/37	43/995
<b>ALTU/L(10-45)</b> mean $\pm$ SD	21,24 $\pm$ 6,97	296 $\pm$ 336,2	11/37	49/1019
ALT – аланин аминотрансфераза; AST – аспартат аминотрансфераза				



Слика 16. Споредба на резултатите од одредената активност на хепаталните ензими меѓу нормалните и покачените вредности

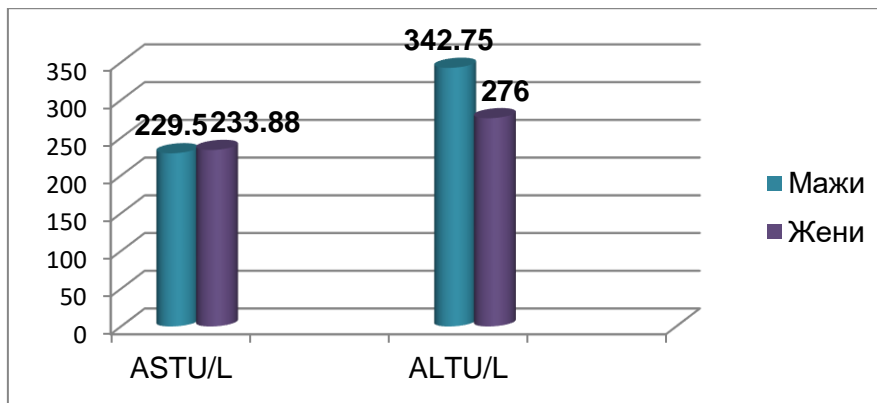
Figure 16. Comparison of the results of the specified activity of the liver enzymes between normal and elevated values

Во табела 11, слика 18, прикажани се вредности на хепаталните ензими кога ја споредуваме поврзаноста на нивната зголемена активност со полот. Беше констатирано дека кај мажите, аритметичката средина на зголемување на активността на AST изнесува  $229,5 \pm 248,8$  U/L, додека кај ALT  $342,75 \pm 454,4$ , така што со пресметка на X2 тестот добивме P вредност од 0,00389 во однос на значајност, за што сметаме дека е средно значаен коефициент. Ист случај беше и кај жените кај кои добивме резултат од  $233,88 \pm 348,9$ U/L во однос на AST, а кај ALT изнесуваше  $276 \pm 301,1$ U/L, каде што P вредноста е 0,00342. На вкупно ниво беше утврден P вредност од 0,00365, што претставува разлика со средно значење за нашиот труд.

Табела 11. Приказ на зголемена активност на AST/ALT кај жени и мажи

Table 11. AST / ALT increased activity in women and men

Пол/ Gender	ASTU/L mean $\pm$ SD	Мин/Макс Min/Max	ALTU/L mean $\pm$ SD	Мин/Макс Min/Max	P-вредност/ P-value
Мажи/Men	229,5 $\pm$ 248,8	43/596	342,7 $\pm$ 454.4	57/1018	P = 0,00389
Жени/Women	233,8 $\pm$ 348,9	49/995	276 $\pm$ 301,1	45/887	P=0,00342
ALT – аланин аминотрансфераза; AST – аспартат аминотрансфераза					



Слика 18. Графички приказна зголемена активност на AST/ALT кај жени и мажи

Figure 18. Graphic display of increased AST / ALT activity in women and men

Резултатите од хепаталните ензими на пациентите коишто во периодот на истражувањето се лекувани со аторвастатин и росувастатин во однос на возраста и индекс на телесна маса (ИТТ) се прикажани во табела 12. Утврдивме дека вредноста за AST кај пациентите лекувани со аторвастатин беа  $363 \pm 386,6 \text{ U/L}$  и за ALT  $389 \pm 427,2 \text{ U/L}$ , а кај пациентите со росувастатин аритметичката средина за AST беше  $70 \pm 31,0 \text{ U/L}$  и за ALT  $116,8 \pm 75,1 \text{ U/L}$ . Во поглед на возраста, просечната возраст во групата пациенти лекувани со аторвастатин беше  $61,28 \pm 11,2$ , додека кај пациентите лекувани со росувастатин беше  $46,33 \pm 7,33$ . Просечниот ИТТ кај пациентите лекувани со аторвастатин изнесуваше  $27,17 \text{ kg/m}^2$ , а кај пациентите лекувани со росувастатин беше пресметан  $27,77 \text{ kg/m}^2$ .

Табела 12. Споредбана AST/ALT во однос на возраст и ИТТ

Table 12. Comparison of AST / ALT with respect to age and BMI

Аторвастатин/ Atorvastatin	ALT U/L mean $\pm$ SD	AST U/L mean $\pm$ SD	Возраст/ Age mean $\pm$ SD	ИТТ/ BMI ( $\text{kg/m}^2$ )
	$389 \pm 427,2$	$363 \pm 386,6$	$61,28 \pm 11,28$	27,15
Росувастатин/ Rosuvastatin	ALT U/L mean $\pm$ SD	AST U/L mean $\pm$ SD	Возраст/ Age mean $\pm$ SD	ИТТ/ BMI ( $\text{kg/m}^2$ )
	$116,8 \pm 75,1$	$70 \pm 31,0$	$46,33 \pm 7.33$	27,77

ИТТ – индекс на телесна маса (BMI – body mass index); ALT – аланин аминотрансфераза; AST – аспартат аминотрансфераза

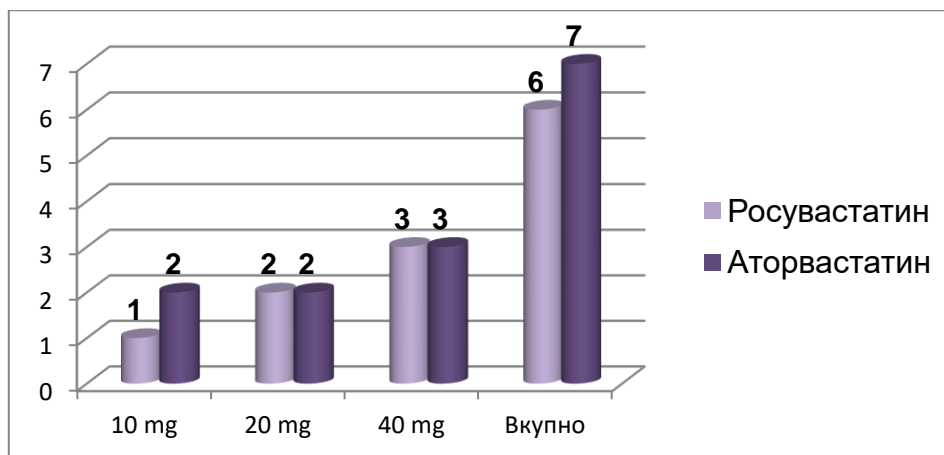
Тоа го потврди очекувањето дека кај субјектите коишто долго време биле лекувани со статини и се постари, може да се предизвикаат следните промени: зголемување на вредностите на серумски аминотрансфери. Со биомониторинг на хепаталните ензими, се докажало дека инциденцата на статин-индуцирано оштетување на црниот дроб можеда се зголеми поради присуството на други фактори на ризик, како: прекумерна тежина, дозата на статинот и интеракција со лекови. Неколку студии докажале дека лицата со прекумерна тежина можат да имаат повисоки вредности на серумски аминотрансфери од тие со нормална тежина (Sheth et al. 1997). Сепак, други студии докажале дека употребата на статини за пациентите со прекумерна тежина се чини дека е подеднакво безбедна како и кај другите пациенти (Kiortsis et al. 2003). Во нашата студија, ефектот на ИТТ врз промените на ензимите ALT/AST не се разликува значително за време на третманот и претпоставуваме дека не беше поврзана со ИТТ.

Во табела 13, слика 19, се дозирани статинска терапија кои беа користени во истражувањето, кај пациентите коишто имаа зголемена активност на ALT и AST. Аторвастатин од 10 mg кај 2 пациенти (28,5%), 20 mg кај 2 пациенти (28,5%), 40 mg кај 3 пациенти (43%), додека росувастатин беше пропишан од 10 mg кај 1 пациент (17%), 20 mg кај 2 пациенти (33%), 40 mg кај 3 пациенти (50%). На местата каде што се повеќе пациенти, утврдена е аритметичката средина.

Табела 13. Приказ за различни дози на аторвастатин и росувастатин

Table 13. Different doses of atorvastatin and rosuvastatin

Статинска терапија кај пациенти со покачени ALT/AST Statin therapy in patients with elevated ALT / AST				Вкупно/Total
Доза/ Dose	10 mg	20 mg	40 mg	
Росувастатин/ Rosuvastatin	1 (17%)	2 (33%)	3 (50%)	6 (46,2%)
Аторвастатин/ Atorvastatin	2 (28,5%)	2 (28,5%)	3 (43%)	7 (53,8%)
Вкупно/Total	3 (23%)	4 (30,7%)	6 (46,1%)	13 (100%)
ALT – аланин аминотрансфераза; AST – аспартат аминотрансфераза				



Слика 19. Терапија со статини

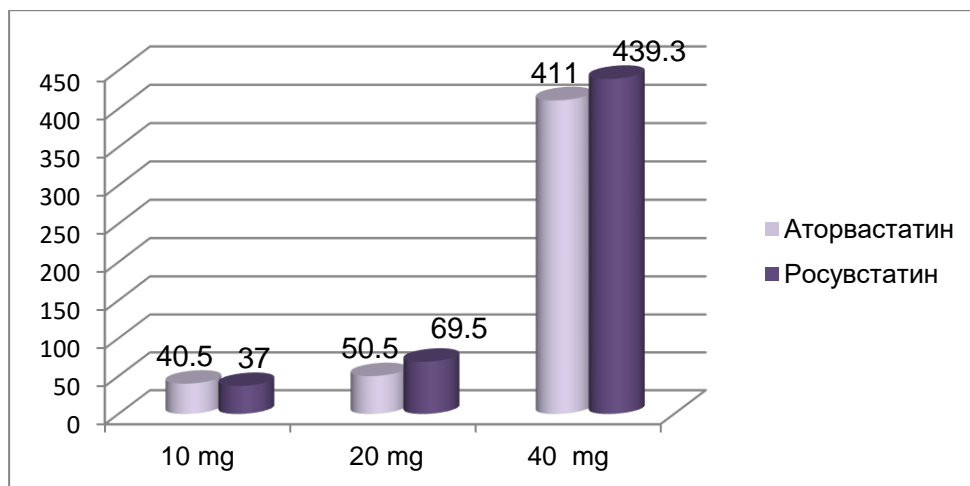
Figure 19. Treatment with statins

Разликите во зголемената активност на AST U/L и дозата на статини, прикажани во табела 14, слика 22, покажуваат дека пациентите лекувани со аторвастатин 40 mg имаат повисока активност за AST со просечна вредност од  $411 \pm 507,8 \text{ U/L}$ , поголема во споредба со аторвастатин 10 mg  $40,5 \pm 3,5 \text{ U/L}$  и со аторвастатин 20 mg  $50,5 \pm 2,1 \text{ U/L}$ . Пациентите лекувани со росувастатин 40 mg исто така имаат повисока активност за AST  $439,3 \pm 261,6 \text{ U/L}$ , кај 20 mg таа изнесува  $69,5 \pm 19,0 \text{ U/L}$  и кај 10 mg  $37 \text{ U/L}$ .

Табела 14. Разликата во зголемената активност на AST U/L и дозата на статини

Table 14. The difference in the increased activity of AST U / L and the statin dose

Аспартат аминотрансфераза и дозата на статини/ Aspartate aminotransferase and the statin dose			
Доза/ Dose	10 mg	20 mg	40 mg
Росуваcтaтин/ Rosuvastatin	37	56	496
	/	83	668
	/		154
[mean $\pm$ SD]	/	$69,5 \pm 19,09$	$439,3 \pm 261,6$
Аторвaстaтин/ Atorvastatin	38	49	996
	43	52	154
			83
[mean $\pm$ SD]	$40,5 \pm 3,53$	$50,5 \pm 2,12$	$411 \pm 507,8$



Слика 20. Разлики во активноста на AST според дозата на статини

Figure 20. Differences in AST activity by statin dose

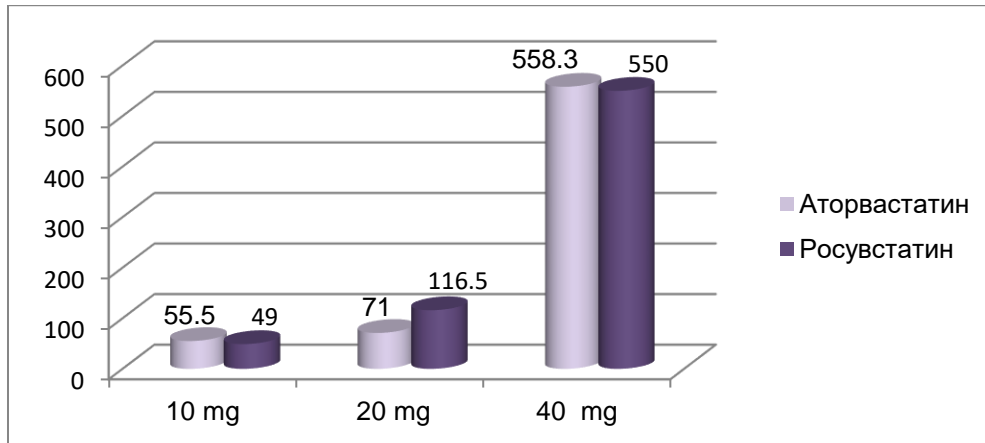
Во покачувањето на ALT, кај пациентите лекувани со аторвастатин ситуацијата е слична, каде што со дозирање 40 mg таа изнесува  $558,3 \pm 430,2$  U/L, кај 20 mg  $71 \pm 31,1$  U/L и кај 10 mg  $55,5 \pm 2,1$  U/L. Во покачувањето на ALT со росувастатин со дозирање 40 mg, таа изнесува  $550 \pm 342,1$  U/L, кај 20 mg таа изнесува  $116,5 \pm 95,4$  U/L и кај 10 mg 49 U/L (таб. 15, сл. 21).

Табела 15. Разликата во зголемената активност на ALT U/L и дозата на статини

Table 15. The difference in the increased activity of ALT U/L and the statin dose

<b>Аланин аминотрансфераза и дозата на статини/ Alanine aminotransferase and the statin</b>			
<b>Доза/ Dose</b>	<b>10 mg</b>	<b>20 mg</b>	<b>40 mg</b>
<b>Росувастатин/ Rosuvastatin</b>	49	184	560
	/	49	207
	/		887
<b>[mean <math>\pm</math> SD]</b>	/	<b>116,5 <math>\pm</math> 95,4</b>	<b>550 <math>\pm</math> 342,1</b>
<b>Аторвастатин/ Atorvastatin</b>	54	93	167
	57	49	1019
			489
<b>[mean <math>\pm</math> SD]</b>	<b>55,5 <math>\pm</math> 2,12</b>	<b>71 <math>\pm</math> 31,11</b>	<b>558,3 <math>\pm</math> 430,2</b>





Слика 21. Разлики во активноста на ALT според дозата на статини

Figure 21. Differences in ALT activity by statin dose

Резултатите покажуваат дека постои значајна врска меѓу зголемената активност на ензимите на црниот дроб и дозата на статини. Така, претпоставуваме дека хепатотоксичноста на различните статини може да биде различна кај различни пациенти, според времетраењето и дозата на терапијата, чувствителноста и други физиолошки параметри.

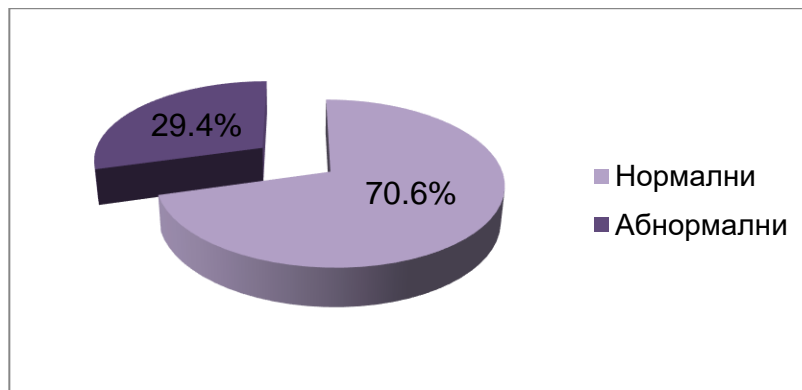
#### Креатин киназа (СК)

Во овој дел е направена анализа на испитаниците со нормална и зголемена активност на креатин киназа (СКU/L). Во студијата се вклучени 34 пациенти (17 мажи и 17 жени, т.е, 50:50), кај 24 пациенти (70,6%) беа забележани нормални вредности за СК U/L, од нив 13 (54,1%) беа жени и 11 (45,9) мажи, додека кај 10 пациенти (29,4%), беа забележани зголемени вредности за СК U/L, од кои 4 беа жени (40%) и 6 мажи (60%), (табела 15, слика 20).

Табела 15. Поделба на пациентите според пол со нормална и зголемена активност на СКU/L

Table 15. Distribution of patients by gender with normal and increased activity of СКU/L

Пол/ Gender	Број на испитаници (N)	
	Нормални/Normal Ензими/Enzymes (СКU/L)	Абнормални/Abnormal Ензими/Enzymes (СКU/L)
Жени/Women	13 (54,1%)	4 (40%)
Мажи/Men	11 (45,9%)	6 (60%)
Вкупно/Total	24 (70,6%)	10 (29,4%)
СК-креатинин киназа		



Слика 22. Графички приказ на пропорциската застапеност со нормална и зголемена активност на CKU/L меѓу пациентите

Figure 22. Graphical display of the proportional representation with normal and increased CK U/L activity among patients

Просечната возраст на вкупниот број испитаници кои беа со нормални вредности на CKU/L изнесуваше  $50,16 \pm 6,78$ , добиените резултати за CK изнесуваа просечно  $73,79 \pm 35,08$  U/L, додека просечната возраст кај пациентите со зголемена активност на CK U/L беше  $72,7 \pm 8,36$ , а добиените резултати за CK беа  $279,9 \pm 79.04$  U/L (Таб. 16).

Табела 16. Поделба на испитаници според возраст и нормална и зголемена активност на CK

Table 16. Separation of respondents by age and normal and increased activity of CK

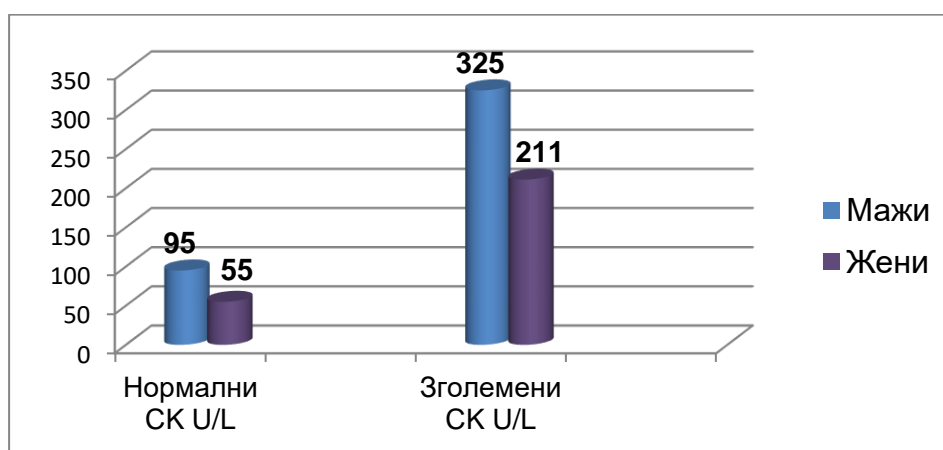
	Возраст/Age [mean $\pm$ SD]	CK U/L [mean $\pm$ SD]
<b>Нормална активност на CK</b> Normal activity of CK	[50,16 $\pm$ 6,78]	[73,79 $\pm$ 35,08]
<b>Зголемена активност на CK</b> Increased CK activity	[72,7 $\pm$ 8,36]	[279,9 $\pm$ 79,04]
CK – креатинин киназа		

Во однос на половиот аспект, разликата во погледна нормална кон зголемена активност на CK U/L, прикажана во табела 17, слика 23, забележително е дека мажите имаат просечни вредностите на нормална активност за CK  $95,63 \pm 36,22$  U/L (45/155 и  $P = 0,0014$ ), а кај жените просечната вредност е  $55,3 \pm$

20,42U/L (24/87 и  $P = 0,0009$ ). Енормна е разликата на СК просечна вредност  $211,75 \pm 21,54$ U/L (188/243 и  $P = 0,0019$ ) кај жените со  $325,33 \pm 70,3$ U/L (258/454 и  $P = 0,0032$ ) кај мажите при зголемени вредности на СК U/L.

Табела 17. Приказ на различна активност на CKU/L меѓу мажи и жени пациенти  
Table 17. Display of a variety of CK U/L activity among men and women patients

Пол Gender	Нормални Normal CKU/L	Покачени Raised CKU/L	Нормални Normal Мин/Макс Min/Max	Покачени Raised Мин/Макс Min/Max	Нормални Normal Рвредност P value	Покачени Raised Р вредност P value
Мажи Men	[95,63 $\pm$ 36,22]	[325,33 $\pm$ 70,3]	45/155	258/454	0,0014	0,0032
Жени Women	[55,3 $\pm$ 20,42]	[211,75 $\pm$ 21,54]	24/87	188/243	0,0009	0,0019
СК-креатинин киназа						



Слика 23. Графички приказ за различна активност на CKU/L меѓу мажи и жени пациенти

Figure 23. Graphic representation of a variety of CKU/L activity among men and women patients

Претпоставуваме дека зголемената активност на CKU/L се должи на поврзаноста со срцевите заболувања, бидејќи сите вредности се вратија во нормала при последователните мерења, и покрај продолжената терапија со статини. Исто така, мораме да напоменеме дека возраста игра важна улога во активността на СК U/L, така што повеќето од испитаниците во оваа студија кои

имаа зголемена активност на CKU/L имаа над 60 години и беа со срцеви заболувања, додека оние со нормални вредности беа помлади пациенти, со основно заболување дислипидемија. Исто така претпоставуваме дека следењето на можните несакани мускулни ефекти треба да биде особено насочено кон ризичните групи (кај физички активните субјекти, кај пациенти со претходно високи CKU/L, постари лица и пациенти со намалена функција на бубрезите или црниот дроб), како и веројатно интеракциите со други лекови. Додека не се спроведат понатамошни испитувања за помалку сериозни мускулни симптоми кај пациенти коишто земаат статини, претпоставуваме дека нема причина да се прекине статинската терапија кај пациенти со висок ризик за кардиоваскуларни нарушувања поради неспецифични симптоми кои не се јасно поврзани со третманот со статин.

Претходно, биомаркерите се користеле за да се идентификуваат биолошките промени поради токсични хемикалии и во проценката на здравјето на животната средина како дел од интегриран пристап. Денес, повеќето истражувања за биомаркери откриваат маркери коишто ќе овозможат да се идентификуваат долгорочните ризици поради токсична изложеност, особено ризикот од развој на карциноми и да се идентификуваат раните маркери на токсичноста во областа на животната средина или екотоксикологијата. Така, со индиректен биомониторинг на хемиски или фармацевтски агенси (како што се статините во нашата студија) и одредување на активноста на хепаталните ензими како биомаркери, може да се потврди хепатотоксичноста врз клетките на црниот дроб. Покрај тоа, со примена на одредени молекуларни, биохемиски и цитогенетски методи, директно може да се изврши детекција, скрининг и квантификација на одредени биомаркери, и со тоа индиректно да се направи биомониторинг на целна група испитаници. Во иднина, поради напредокот на молекуларната епидемиологија, ќе бидат достапни многу повеќе биолошки маркери со коишто ќе може да се предвидуваат долгорочни ефекти и да се направи попрецизен начин на проценката на ризикот (Waterfield & Timbrell, 1999).

## 5. Заклучок (Conclusion)

- Биомониторингот овозможува да се детектираат цитоморфолошки и биохемиски промени коишто се резултат на реакцијата на изложеноста на организмот на одредени физички, хемиски или биолошки агенси;
- Изложеноста на хепатотоксични супстанции предизвикува промени во хомеостазата на различни биохемиски маркери во телесните течности или ткива;
- Клиничката евалуација на различни биолошки маркери има важна улога во точната дијагноза, како и за проценката на ризикот и прифаќање на терапија што го подобрува клиничкиот исход;
- Следењето на хепаталните ензими и на другите ензими како креатинин киназа е од суштинско значење кај пациентите кои се на статинска терапија;
- Мониторингот со помош на различни лабораториски методи, во корелација со дозата и типот на статинската терапија и степенот на хепатотоксиколошките ефекти, може да ја потврди нивната хепатотоксичност;
- Зголемените вредности на аминотрансферазите претставуваат ефект поврзан со дозата, поголеми дози од овие хемиски агенси можат да дејствуваат летално или токсично;
- Малите дози на статини можат да имаат кумулативен ефект, да се задржат подолг временски интервал и последиците да бидат потврдени многу подоцна;
- Оваа студија покажува дека високите вредности на хепаталните ензими се во корелација со BMI и со други параметри, и вообичаено се придружна состојба од други здравствени проблеми кои инаку лесно можат да се спречат;
- Врз основа на разгледаната литература и истражувањата, докажано е дека придобивките од интензивната употреба на статини во примарната и секундарна превенција на CVD, во голема мера ги надминуваат ризиците од сериозно или трајно оштетување на мускулите.
- Како и со сите лекови, пациентите и лекарите треба да бидат свесни за можните негативни ефекти и треба да се охрабруваат нив да ги пријавуваат;
- Во иднина, потребни се повеќе студии за докажување на хепатотоксичните и мускулните ефекти од статини.

## 6. Користена литература (References and used literature)

1. Abu Rajab, M. & Kaplan, M. M. (2010). Statins in primary biliary cirrhosis: Are they safe? *Dig Dis Science*, 55, pp.2086–2088.
2. Al Shukry, A., Rashed, W., Zubaid, M. (2009). The use of evidence-based therapy in acute myocardial infarction patients admitted to hospital during the Gulf registry of acute coronary events (Gulf Race). *Heart Views*, 10, pp.6–10.
3. Albrecht, W. (2017). Highlight report: Prediction of drug induced liver injury (DILI) with human hepatocytes in vitro. *Archive Toxicology*, 91 (12), pp.4021–4022.
4. Alonso, J. J., Osorio, J. M., Cabello, F. G., Osa, A. L., Leon, L. & Garcia, J. D. M. (1999). Atorvastatin induced cholestatic hepatitis in a young woman with systemic lupus erythematosus. *Archive Internal Medicine*, 159, pp.1811–1812.
5. Alsheikh-Ali, A. A., Maddurkuri, P. V., Han, H. & Karas, R. H. (2007). Effect of lipid lowering on risk of elevated liver enzymes, rhabdomyolysis, and cancer: insights from large randomized statin trials. *Journal of American Coll Cardiology*, 50, pp.409–418.
6. Amacher, D. E., Schomaker, S. J. & Aubrecht, J. (2013). Development of blood biomarkers for drug-induced liver injury: an evaluation of their potential for risk assessment and diagnostics. *Molecular Diagnostic Therapy*, 2 (1),
7. Argo, C. K., Loria, P., Caldwell, S. H. & Lonardo, A. Statins in liver disease: a molehill, an iceberg, or neither?. *Hepatology*. 2008; 48: 662–669.
8. Arimoto, R. (2006). Computational models for predicting interactions with cytochrome p450 enzyme. *Top Medical Chemistry*, 6 (15), 1609–1618.
9. Australian Adverse Drug Reactions Advisory Committee (ADRAC). (2004). Risk factors for myopathy and rhabdomyolysis with the statins. *Australian Adverse Drug React Bull*, 23 (1), p.2.
10. Avins, A. L., Manos, M. M. & Ackerson, L. (2008). Hepatic effects of lovastatin exposure in patients with liver disease: a retrospective cohort study. *Drug Safety*, 31 (4), pp.325–334.
11. Avins, A. L., Manos, M. M. & Levin, T. R. (2006). Lovastatin is not hepatotoxic to patients with pre-existing liver disease. *Gastroenterology*, 130 (4), p.595.
12. Barrett, J., Vainio, H., Peakall, D. & Goldstein, B. (1997). 12th Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspectives*, 104 (4), pp.699–737.
13. Bays, H. (2006). Statin safety: an overview and assessment of the data 2005. *American Journal of Cardiology*, 97, pp.6C–26C.

14. Biomarkers Definition Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. (2001). *Clinical Pharmacology Therapeutics*; 69, pp.89–95.
15. Björnsson, E. S. (2017). Hepatotoxicity of statins and other lipid-lowering agents. *Liver International*, 37, pp.173–178.
16. Björnsson, E., Olsson, R. (2005). Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology*, 42 (2), pp.481–489.
17. Bonetti, P. O., Lerman, L. O., Napolitano C. & Lerman A. (2003). *European Heart Journal*, 24, pp.225–248.
18. Bradford, R. H., Shear, C. L. & Chremos, A. N. (1994). Expanded Clinical Evaluation of Lovastatin (EXCEL) study results: two-year efficacy and safety follow-up. *American Journal of Cardiology*, 74 (7), pp.667-673.
19. Bruckert, E., Hayem G. & Dejager, S. (2005). Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients - the PRIMO study. *Cardiovascular Drugs Therapy*, 19, pp.403-414.
20. Burhop, K., Gordon, D. & Estep, T. (2004). Review of hemoglobin induced myocardial lesions. *Artificial Cells Blood Substitute Immobile Biotechnology*, 32, pp.353–374.
21. Cannon, C. P., Braunwald, E. & McCabe, C. H. (2004). Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy – Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes published correction appears in *North England Journal of Medicine*, 354 (7), p.778. *North England Journal of Medicine*, 350 (15), p.1495-1504.
22. Cerný, D., Canová, N. K., Martínek, J., Horínek, A., Kmoníčková, E. & Zídek, Z. (2009). Effects of resveratrol pretreatment on tert-butyl hydroperoxide induced hepatocyte toxicity in immobilized perfused hepatocytes: Involvement of inducible nitric oxide synthase and hemoxygenase-1. *Nitric Oxide*, 20 (1), pp.1-8.
23. Chalasani, N. (2005). Statins and hepatotoxicity: Focus on patients with fatty liver. *Hepatology*, 41, p.690.
24. Chalasani, N., Aljadhey, H., Kestersonm J., Murray, D. & Hall, S. (2004). Patients with elevated liver enzymes are not at higher risk for statin hepatotoxicity. *Gastroenterology*, 126 (5), pp.1287-1292.
25. Chang, T. T. & Hughes-Fulford, M. (2009). Monolayer and Spheroid Culture of Human Liver Hepatocellular Carcinoma Cell Line Cells Demonstrate Distinct Global Gene Expression Patterns and Functional Phenotypes. *Tissue Engineering Part A*, 15 (3), pp.559-567.
26. Chen, M. , Suzuki, A. , Borlak, J. , Andrade, R. J. & Lucena, M. I. (2015). Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *Journal of Hepatology*, 63 (2), pp.503–514.
27. Cohen, D., Anania, F. & Chalasani, N. (2006). An assessment of statin safety by hepatologists. *American Journal of Cardiology*, 97, pp.77-81.
28. De Denu, S., Spinler, S. A., Miller, K. & Peterson, A. M. (2004). Statins and liver toxicity: a meta-analysis. *Pharmacotherapy*, 24 (5), pp.584-591.



29. Downs, J. R., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., Shapiro, D. R. & Beere, P. A (1998). Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: Results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*, 279, pp.1615-1622.
30. Dujovne, C. A. (2002). Side effects of statins: hepatitis versus „transaminitis“–myositis versus CPKitis. *American Journal of Cardiology*, 89, pp.1411–1413.
31. Данијела, Ј. и Марија, А. (2015) „Скрипта по клиничка биохемија“ Штип: Универзитет "Гоце Делчев", Факултет за медицински науки.
32. Ekstedt, M., Franzen, L. E., Mathiesen, U. L., Holmqvist, M., Bodemar, G. & Kechagias, S. (2007). Statins in non-alcoholic fatty liver disease and chronically elevated liver enzymes: A histopathological follow-up study. *Journal of Hepatology*.
33. Farghali, H. (2008). Perfused immobilized hepatocytes for metabolic studies. In: Berry, M. N. & Edwards, A. M. (eds). *Hepatocyte Review*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp.181-193.
34. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: Important Safety Label Changes to Cholesterol. Lowering Statin Drugs. [online]. Достапно на: <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm293101.htm> [посетено на: 08.04.2019]
35. Forrester, J. S. & Libby, P. (2007). The inflammation hypothesis and its potential relevance to statin therapy. *American Journal of Cardiology*, 99, pp.732–738.
36. Forrester, J. S., Libby, P. (2007). The inflammation hypothesis and its potential relevance to statin therapy. *American Journal of Cardiology*, 99, pp.732–738.
37. Funk, C. & Roth A. (2017). Current limitations and future opportunities for prediction of DILI from in vitro. *Archives Toxicology*, 91 (1), pp.131–142.
38. Giboney, P. T. (2005). Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *American Family Physician*, 71, pp.1105–1110.
39. Gillies, R. J., Chresand, T. J., Drury, P. D., Dale, B. E. (1986). Design and application of bioreactors for analyses of mammalian cells by NMR. *Review Magnetic Medical*, 1, pp.155-179.
40. Girotra, S., Murarka, S. & Migrino, R. Q. (2012). Plaque regression and improved clinical outcomes following statin treatment in atherosclerosis. *Panminerva Medical*, 54, pp.71-81.
41. Gotto, A. M. (2003). Safety and statin therapy: Reconsidering the risks and benefits. *Archives Intern Medicine*, 163, pp.657-659.
42. Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Merz, C. N., Brewer, H. B. & Clark, L. T. (2004). Hunninghake, D. B. (2004). Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*, 110, pp.227–239.
43. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial. (2002). *Lancet*, 360, pp.7-22.

44. Horsmans, Y., Desager, J. P. & Harvengt, C. (1990). Biochemical changes and morphological alterations of the liver in guinea-pigs after administration of simvastatin (HMG CoA reductase-inhibitor). *Pharmacological Toxicology*, 67, pp.336–339.
45. Istvan, S. & Deisenhofer, J. (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, 292, pp.1160-1164
46. Jacobson, T. A. (2006). Statin safety: lessons from new drug applications for marketed statins. *American Journal of Cardiology*, 97, pp.44C–51C.
47. Kashani, A., Phillips, C. O., Foody, J. M., Wang, Y., Mangalmurti, S. & Ko, D. T. (2006). Risks associated with statin therapy: A systematic overview of randomized clinical trials. *Circulation*, 114, pp.2788-2797.
48. Kiortsis, D., Nikas, S., Hatzidimou, K., Tsianos, E. and Elisaf, M.S. (2003) Lipid-Lowering Drugs and Serum Liver Enzymes: The Effects of Body Weight and Baseline Enzyme Levels. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 17, 491- 494.
49. Khorashadi, S., Hasson, N. K. & Cheung, R.C. (2006). Incidence of statin hepatotoxicity in patients with hepatitis *Journal of Clinical Gastroenterology Hepatology*, 4, pp.902–907.
50. Kumar, S., Grace, N. D. & Qamar, A. A. (2014). Statin use in patients with cirrhosis: A retrospective cohort study. *Dig Dis Science*, 59, pp.1958–1965.
51. Kunz-Schughart, L. A. (2004). The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. *Journal of Biomolecular Screening*, 9 (4), pp.273-285.
52. Law, M. & Rudnicka, A. R. (2006). Statin safety: a systematic review. *American Journal of Cardiology*, 97 (8A), pp.52C-60C.
53. Law, M. R., Wald, N. J. & Rudnicka, A. R. (2003). Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 326, p.1423.
54. Lewis, J. H., Fusco, M. J., Medoff, J. R., Mortensen, M. E. & Zweig, S. (2006). Safety and efficacy of pravastatin 80 mg in 320 hypercholesterolemic patients with compensated chronic liver disease. *Gastroenterology*, 130 (4), p.65.
55. Lewis, J. H., Mortensen, M. E., Zweig, S., Fusco, M. J., Medoff, J. R. & Belder, R. (2007). Efficacy and safety of high-dose pravastatin in hypercholesterolemic patients with well-compensated chronic liver disease: results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Hepatology*, 46 (5), pp.1453-1463.
56. Macdonald, J. M., Grillo, M., Schmidlin, O., Tajiri, D. T. & James, T.L. (1998). NMR spectroscopy and MRI investigation of a potential bioartificial liver. *NMR Biomedical*, 11 (2), pp.55-66.
57. Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M. & Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192, pp.3-16.
58. Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M. & Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology Letters*, 192, pp.3-16.

59. Martin, J. E., Cavanaugh, T. M., Trumbull, L., Bass, M., Weber, F. & Aranda-Michel, J. (2008). Incidence of adverse events with HMG-CoA reductase inhibitors in liver transplant patients. *Clinical Transplantation*, 22, pp.113–119.
60. Martinez, T. L. & Nascimento, H. M. (2005). Special recommendations for lipid-lowering treatment: efficacy and safety]. *Arq Bras Cardiology*, 85 (5), pp.6-8.
61. McKenney, J. M., Davidson, M. H., Jacobson, T. A. & Guyton, J. R. (2006). National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force. Final conclusions and recommendations of the National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force. *American Journal Cardiology*, 97 (8A), pp.89C-94C.
62. Merck Sharp & Dohme (New Zealand) Limited. Lipex Data Sheet February 2003. [online]Достапно на: [www.medsafe.govt.nz/Profs/Datasheet/I/Lipex.htm](http://www.medsafe.govt.nz/Profs/Datasheet/I/Lipex.htm) [посетено на: 12.04.2019]
63. Metcalf, S.W. & Orloff, K.G. (2004). Biomarkers of exposure in community settings. *Journal of Toxicology Environment, Health Academy*, 67 (8-10), pp.715-726.
64. Mills, E. J., O' Regan, C., Eyawo, O., Wu, P., Mills, F. & Berwanger, O. (2011). Intensive statin therapy compared with moderate dosing for prevention of cardiovascular events: A meta-analysis of >40 000 patients. *European Heart Journal*, 32, pp.1409–1415.
65. Mitka, M. (2003). Expanding statin use to help more at-risk patients is causing financial heartburn. *JAMA*, 290, pp.2243–2245.
66. Mulder, A. B., van Lijf, H. J., Bon, M. A., van den Bergh, F. A., Touw, D. J & Neef, C. (2001). Association of polymorphism in the cytochrome CYP2D6 and the efficacy and tolerability of simvastatin. *Clinical Pharmacology Therapy*, 70, pp.546-551.
67. Nathwani, R. A., Pais, S., Reynolds, T.B. & Kaplowitz, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41, pp.380–382.
68. Newman, C., Tsai, J. & Szarek, M. (2006). Comparative safety of atorvastatin 80 mg versus 10 mg derived from analysis of 49 completed trials in 14,236 patients. *American Journal of Cardiology*, 97, pp.61–67.
69. Onofrei, M. D., Butler, K. L., Fuke, D. C. & Miller, H. B. (2008). Safety of statin therapy in patients with preexisting liver disease. *Pharmacotherapy*, 28, pp.522–529.
70. Parra, J. L., Reddy, K. R. (2003). Hepatotoxicity of hypolipidemic drugs. *Clinical Liver Diseases*, 7, pp.415-433.
71. Pasternak, R. C., Smith, S. C. J. & Bairey-Merz, C. N. (2002). ACC/AHA /NHLBI Clinical Advisory on the Use and Safety of Statins. *Circulation*, 106 (8), pp.1024-1028.
72. Pedersen, T. R., Kieksus, J., Berg, K. & Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. (1994). Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, 344, pp.1383–1389.
73. Pfeffer, M. A., Keech, A., Sacks, F. M. (2002). Safety and tolerability of pravastatin in long-term clinical trials: prospective pravastatin pooling (PPP) project. *Circulation*, 105 (20), pp.2341-2346.

74. Pfizer Laboratories Limited. Lipitor Data Sheet 30 September 2003 [online].  
Достапно на: [www.medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/l/Lipitortab.htm](http://www.medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/l/Lipitortab.htm) [посетено на: 10.04.2019]
75. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). (1994). *Lancet*, 344, pp.1383-1389.
76. Reuben, A. (2004). Hy's law. *Hepatology*, 39, pp.574-578.
77. Rifai, N., Gillette, M. A. & Carr, S. A. (2006). Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature biotechnology*, 24, pp.971-983.
78. Robles-Diaz M, Medina-Caliz, I., Stephens, C., Andrade, R. J. & Lucena, M. I. (2016). Biomarkers in DILI: One More Step Forward. *Front Pharmacology*, 7, p.267.
79. Rockville, M. D. (2012). Food and Drug Administration. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: Important Safety Label Changes to Cholesterol Lowering Statin Drugs.[online] Достапно на: <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm293101.htm> [посетено на: 20.04.2019]
80. Russo, M. W., Galanko, J. A., Shrestha, R., Fried, M. W. & Watkins, P. (2004). Liver transplantation for acute liver failure from drug induced liver injury in the United States. *Liver Transplantation*, 10, pp.1018–1023.
81. Рушковска, Т. (2019): Клиничка Биохемија – Скрипта, Штип : Универзитет "Гоце Делчев", Факултет за медицински науки.
82. Sahu, P., Pinkalwar, N., Dhar Dubey, R., Paroha, S., Chatterjee, Sh. & Chatterjee, T. (2011). Biomarkers: An Emerging Tool for Diagnosis of a Disease and Drug Development. *Asian Journal of Pharmacology Science*, 1 (1), pp.9-16.
83. Schadt, S., Simon, S., Kustermann, S., Boess, F., McGinnis, C. & Brink, A. (2015). Minimizing DILI risk in drug discovery - A screening tool for drug candidates. *Toxicology in vitro*, 30 (1), pp.429–437.
84. Sinzinger, H., Wolfram, R. & Peskar, B. A. (2002). Muscular side effects of statins. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 40, pp.163-171.
85. Sheth, S., Gordon, F. and Chopra, S. (1997) Nonalcoholic Steatohepatitis. *Annals of Internal Medicine*, 126, 137-145. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-126-2199701150-00008>.
86. Talbert, R. (2006). Safety issues with statin therapy. *Journal of American Pharmacology Associates*, 46 (4), pp.479-488.
87. Taylor, F., Huffman, M. D. & Macedo, A. F. (2013). Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Systematic Review*, 1 (1).
88. Torpy, J., Burke, A. & Glass, R. (2009). Coronary Heart Disease Risk Factors. *JAMA*, 302, p.2388.
89. Vasudevan, A. R., Hamirani, Y. S. & Jones, P. H. (2005). Safety of statins: effects on muscle and the liver. *Cleve Clinical Journal of Medicine*, 72, pp.990-993, 996-1001.
90. Verschaeve, L. (2015). *Genetic toxicology: tests and applications*. Antwerpen: University Press Antwerp.

91. Voit, E. O. (2000). *Computational analysis of biochemical systems: a practical guide for biochemists and molecular biologists*. Cambridge: Cambridge University Press.
92. Vuppalachani, R., Teal, E. & Chalasani, N. (2005). Patients with elevated baseline liver enzymes do not have higher frequency of hepatotoxicity from lovastatin than those with normal baseline liver enzymes. *American Journal of Medical Science*, 329 (2), pp.62-65.
93. Waterfield, C. & Timbrell, J. A. (1999). *Biomarkers – An Overview*. In: Genetic Applied Toxicology, 2<sup>nd</sup> ed., London: Stockton Press.
94. Weismantel, D. (2001). What laboratory monitoring is appropriate to detect adverse drug reactions in patients on cholesterol-lowering agents? *Journal of Family Practice*, 50, pp.927-928.
95. WHO (2001). *Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. Environmental Health Criteria*. Geneva: World Health Organization, pp. 238. [online]. Достапно на: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm> [посетено на: 10.04.2019].
96. WHO International Program on Chemical Safety Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. (1993).
97. WHO International Program on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation (2001). [online]. Достапно на: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm> [посетено на: 12.04.2019].
98. Wlodarczyk, J., Sullivan, D. & Smith, M. (2008). Comparison of benefits and risks of rosuvastatin versus atorvastatin from a meta-analysis of head-to-head randomized controlled trials. *American Journal of Cardiology*, 102 (12), pp.1654-1662.
99. Zimmerman, H. J. (1978). Drug-Induced Liver Disease. In: *Hepatotoxicity, The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver*, 1<sup>st</sup> ed, New York: Appleton Century Crofts, pp. 351-353.
100. Zimmerman, H. J. (1999). Drug-Induced Liver Disease. In: *Hepatotoxicity, The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver*, 2<sup>nd</sup> ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 428-433.
101. Zucco, F., de Angelis, I., Testai, E. & Stamatii, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicology. in vitro*, 18, pp.153–163.
102. Odden, M. C., Pletcher, M. J. & Coxson, P. G. (2015). Cost-effectiveness and population impact of statins for primary prevention in adults aged 75 years or older in the United States; statins for primary prevention in U.S. adults aged 75 years or older. *Annual Internal Medicine*, 162 (8), pp.533–541.